



Eur päisch s Patentamt
Europ an Patent Offic
Office eur péen des brevets



(11) Numéro de publication : **0 596 812 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **93420334.0**

(22) Date de dépôt : **06.08.93**

(51) Int. Cl.⁵ : **C12N 15/55, C12N 9/78,
C12N 1/21, C07K 3/08,
C12P 7/40, C12P 7/44,
// (C12N1/21, C12R1:19)**

Le demandeur a ultérieurement déposé une liste des séquences et déclaré, que cette liste ne comporte aucun élément nouveau.

Une requête en rectification certain pages de la description quand aux références à la liste de séquences a été présentée conformément à la règle 88 CBE. Il est statué sur cette requête au cours de la procédure engagée devant la division d'examen (Directives relatives à l'examen pratiqué à l'OEB, A-V, 2.2).

(30) Priorité : **10.08.92 FR 9209882**

(43) Date de publication de la demande :
11.05.94 Bulletin 94/19

(84) Etats contractants désignés :
BE DE ES FR GB IT NL

(71) Demandeur : **RHONE-POULENC CHIMIE
25, quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie Cédex (FR)**

(72) Inventeur : **Petre, Dominique
43, rue Duquesne
F-69006 Lyon (FR)
Inventeur : Cerbelaud, Edith
265, chemin de Fontainières
F-69350 La Mulatière (FR)
Inventeur : Levy-Schil, Sophie
2, rue de Monttessuy
F-75007 Paris (FR)
Inventeur : Crouzet, Joel
48-52, rue des Meuniers
F-75012 Paris (FR)**

(74) Mandataire : **Ropital-Bonvarlet, Claude
Cabinet Beau de Loménie, 51 Avenue Jean
Jaurès, B.P. 7073
F-69341 LYON CEDEX (FR)**

(54) **Nitrilase recombinante et son utilisation.**

(57) La présente invention a pour objet de polypeptides présentant une activité nitrilase, ainsi que les outils génétiques pour les produire, à savoir :

- la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase et capable d'hydrolyser les nitriles en carboxylates,
- un analogue de cette séquence résultant de la dégénérescence du code génétique,
- une séquence d'ADN hybridant avec l'une de ces séquences ou un fragment de celles-ci et codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase.
- cassettes d'expression et micro-organismes permettant leur obtention.

Application : transformation enzymatique des nitriles en carboxylates.

EP 0 596 812 A1

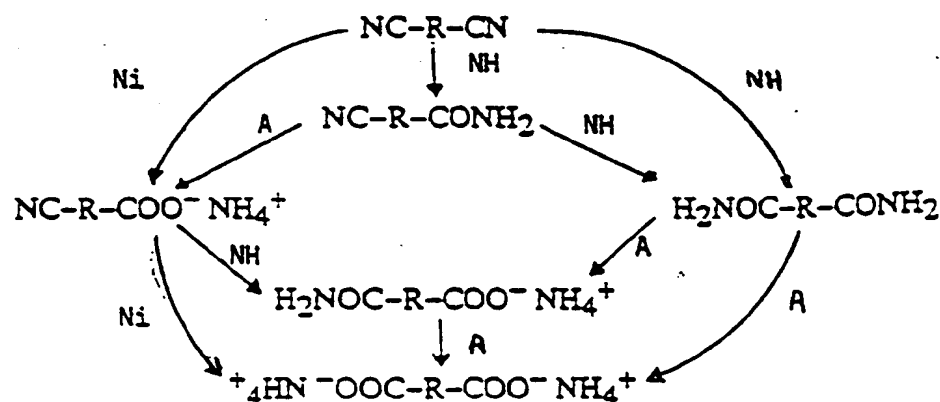
Jouve, 18, rue Saint-Denis, 75001 PARIS

La présente invention a pour objet de nouveaux polypeptides présentant une activité nitrilase, les outils de génie génétique pour les produire, à savoir une séquence d'ADN, les cassettes d'expression portant cette séquence d'ADN recombinant et les micro-organismes recombinés (micro-organismes hôtes) contenant ladite séquence d'ADN.

La présente invention a également pour objet un procédé de transformation enzymatique des nitriles en carboxylates au moyen des polypeptides selon l'invention ou d'un micro-organisme hôte contenant la séquence d'ADN selon l'invention. Une application particulière du procédé de l'invention est la synthèse enzymatique de l'adipate d'ammonium ou du cyano-5 valérate d'ammonium par hydrolyse de l'adiponitrile à l'aide d'un polypeptide ou d'un micro-organisme hôte selon l'invention.

On sait que l'adipate d'ammonium est un produit particulièrement intéressant car il peut être transformé en acide adipique, un produit lui-même largement utilisé pour la préparation du Nylon-6,6.

L'hydrolyse enzymatique des dinitriles a été décrite par de nombreux auteurs. Cependant, les voies d'hydrolyse de ces dinitriles en acides organiques ne sont pas souvent évoquées. Le schéma théorique d'hydrolyse est le suivant :



NH = nitrile hydratase

Ni = nitrilase

A = amidase

R = $(\text{CH}_2)_n$, n étant un nombre entier égal à 4 dans le cas de l'adiponitrile.

En fait, on note très souvent que certaines voies sont privilégiées et que certains produits ne se forment pas ou bien ne sont pas hydrolysés.

Parmi les micro-organismes chez lesquels on a pu démontrer l'existence d'une activité enzymatique permettant cette hydrolyse, on peut citer notamment les souches appartenant au genre *Fusarium*, qui dégradent le succinonitrile et l'adiponitrile sans indication sur les produits de la réaction [Goldlust et al., Biotechnol. and Appl. Biochem., 1989, 11, 581]; les souches appartenant au genre *Pseudomonas*, qui dégradent l'adiponitrile [Yanase et al., Agric. Biol. Chem., 1982, 46, 2925]; et les souches appartenant au genre *Rhodococcus*, en particulier *Rhodococcus rhodochrous* NCIB 11 216, qui hydrolyse l'adiponitrile en acide adipique [Bengis-Garber et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 32, II] et aussi *Rhodococcus rhodochrous* K22 dont la nitrilase permet l'hydrolyse de l'adiponitrile et du glutaronitrile [Yamada et al., J. Bacteriol., 1990, 172 (9), 4807-4815], cependant avec un rapport d'activité faible comparativement à celui de l'hydrolyse des nitriles aromatiques.

Par conséquent, on voit que l'hydrolyse enzymatique des dinitriles est assez complexe: dans tous les cas, la première fonction CN est bien hydrolysée par l'enzyme, alors que la deuxième fonction ne l'est pas du tout dans certains cas ou bien avec une vitesse très faible dans d'autres.

On a maintenant trouvé qu'il était possible d'hydrolyser totalement et rapidement les nitriles en carboxylates et plus particulièrement les dinitriles en carboxylates ou dicarboxylates en faisant appel à des enzymes convenablement sélectionnées, utilisées soit telles quelles, soit, de préférence, sous la forme de micro-organismes recombinés les générant.

La présente invention a donc pour objet de nouveaux polypeptides ayant une activité nitrilase, qui ont été isolés à partir d'une souche de *Comamonas testosteroni*. Plus précisément, ces polypeptides sont préparés par extraction et purification à partir de cultures de micro-organismes naturels ou recombinants, la purification étant réalisée par une succession d'étapes consistant à préparer un extrait enzymatique à partir de la culture cellulaire, à précipiter cet extrait avec du sulfate d'ammonium et à le purifier par différentes étapes de chromatographie et filtration sur gel. Ces étapes, qui font appel à des techniques bien connues de l'homme du mé-

tier, sont décrites en détail dans les exemples illustratifs ci-après.

Par "activité nitrilase", on désigne dans la présente description la conversion directe d'un nitrile en carboxylate d'ammonium, l'amide correspondant n'étant pas un substrat de l'enzyme.

Un autre objet de l'invention concerne une séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase. La séquence d'ADN codant pour un polypeptide de l'invention peut être choisie parmi :

- la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase, telle que représentée à la fig. 4,
- un analogue de cette séquence résultant de la dégénérescence du code génétique,
- ou bien une séquence d'ADN hybridant avec l'une de ces séquences ou avec un fragment de celles-ci et codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase.

Une telle séquence d'ADN peut être obtenue par clonage du fragment d'AdN génomique codant pour le polypeptide recherché, à l'aide de sondes nucléotidiques élaborées à partir du polypeptide purifié.

L'invention concerne également les cassettes d'expression qui portent, avec les signaux assurant son expression, la séquence d'ADN recombinant définie précédemment. Ces cassettes d'expression peuvent être soit intégrées dans le génome de l'hôte, soit localisées sur un vecteur d'expression, tel qu'un plasmide contenant un moyen de sélection.

Ces cassettes d'expression comportent notamment des régions d'initiation de la transcription et de la traduction, qui contiennent un site de fixation des ribosomes et une séquence promotrice. Ces régions peuvent être homologues ou hétérologues du micro-organisme produisant naturellement le polypeptide.

Le choix de ces régions dépend notamment de l'hôte utilisé. En particulier, lorsqu'il s'agit de micro-organismes hôtes procaryotes, le promoteur hétérologue peut être choisi parmi les promoteurs bactériens forts, tels que le promoteur de l'opéron tryptophane P_{trp} de *E. coli*, le promoteur de l'opéron lactose Plac de *E. coli*, le promoteur droit du phage lambda P_R, le promoteur gauche du phage lambda P_L, les promoteurs forts de *Pseudomonas* et *Comamonas*, les promoteurs forts de *Corynebactéries*.

Plus particulièrement, dans le cas du promoteur droit du phage lambda, la forme thermosensible P_RCIts pourra être préférée. Dans le cas des micro-organismes eucaryotes, tels les levures, les promoteurs peuvent être issus de gènes glycolytiques de levure, tels les gènes codant pour la phosphoglycérate kinase (PGK), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), la lactase (LAC4), l'énolase (ENO).

Concernant les sites de fixation des ribosomes, celui dérivé du gène CII de lambda ainsi que ceux dérivés de gènes homologues de *Comamonas* ou *Pseudomonas* ou ceux dérivés de gènes de *Corynebactéries* sont utilisés préférentiellement lorsque le micro-organisme hôte est procaryote.

Une région permettant une terminaison de la traduction et de la transcription fonctionnelle de l'hôte envisagé peut être positionnée en 3' de la séquence codante. La cassette d'expression comprend également un ou plusieurs marqueurs permettant de sélectionner l'hôte recombinant. Les marqueurs préférés sont des marqueurs dominants, c'est-à-dire conférant une résistance à des antibiotiques comme l'ampicilline ou la streptomycine ou à d'autres produits toxiques.

Parmi les micro-organismes hôtes utilisés, on peut citer notamment les entérobactéries telles que *E. coli*, les bactéries appartenant aux genres *Comamonas* ou *Pseudomonas*, les bactéries corynéformes telles que celles appartenant aux genres *Corynebactérium*, *Brevibacterium* ou *Rhodococcus*.

L'invention a également pour objet les micro-organismes contenant la séquence d'ADN recombinante selon l'invention, par exemple sur un plasmide comportant un moyen de sélection.

Un micro-organisme recombiné contenant ladite séquence d'ADN sur une structure plasmidique a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (C.N.C.M.) (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris) sous le n°I-1242 le 21 juillet 1992. Ce micro-organisme est la souche *E. coli* TG1 qui contient le plasmide pXL2148 ; ce micro-organisme est également identifié par la Demanderesse par la référence G4207.

L'invention a également pour objet les micro-organismes susceptibles de transformer des nitriles en carboxylates et plus particulièrement des dinitriles aliphatiques de formule NC - R - CN dans laquelle R est un groupe alkylène linéaire ou ramifié ayant de 1 à 10 atomes de carbone en carboxylates.

Au-delà de l'acquisition de leurs structures I et II lors de leur synthèse par les micro-organismes selon l'invention, il est important que les polypeptides considérés se stabilisent dans leurs structures III et IV, de façon à être doués d'une activité nitrilase optimale.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir découvert des moyens pour favoriser la susdite stabilisation. Ainsi, tout micro-organisme selon l'invention contient, de préférence :

- au moins un agent protéique d'aide au repliement des polypeptides qu'il synthétise et, en particulier, de la nitrilase dont il est question dans le présent exposé,
- et/ou les gènes codant pour un tel agent, cet agent étant présent dans une quantité supérieure à celle correspondant au niveau de base du micro-organisme considéré.

Par niveau de base, on entend, au sens de la présente invention, le niveau maximum pouvant être atteint

par le micro-organisme sauvage correspondant considéré.

Avantageusement, cet agent est la chaperone GroE de *E. coli* ou son homologue d'origine eucaryote ou procaryote.

La chaperone GroE d'*E. coli* est normalement présente dans les souches sauvages.

Les gènes codant pour l'agent sont portés par le chromosome ou par un élément extra-chromosique (plasmide, phage). Il est préférable de les amplifier par tout moyen connu et approprié, de manière à favoriser la synthèse d'agent dans le micro-organisme.

Les gènes codant pour l'agent sont sous la dépendance de systèmes d'expression homologues ou hétérologues de leur micro-organisme hôte.

L'invention concerne aussi le procédé de transformation des nitriles en carboxylates à l'aide d'un polypeptide selon l'invention ou d'un micro-organisme recombiné le générant. Ce procédé consiste à mettre en présence le nitrile à transformer avec un polypeptide ou un micro-organisme recombiné tel que défini précédemment. On opère généralement à la température ambiante. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le polypeptide ou le micro-organisme recombiné est immobilisé sur ou dans un support solide.

Le procédé de l'invention convient pour la transformation des nitriles en carboxylates et plus particulièrement pour la transformation en carboxylates des dinitriles de formule NC - R - CN dans laquelle R est un groupe alkylène linéaire ou ramifié contenant 1 à 10 atomes de carbone.

Le procédé de l'invention est particulièrement approprié pour la synthèse enzymatique de l'adipate d'ammonium à partir d'adiponitrile.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer les caractéristiques et les avantages de la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

DESCRIPTION DES FIGURES

La fig. 1 représente le rendement (%) d'hydrolyse de l'adiponitrile en cyanovalérate (courbe a) et en adipate d'ammonium (courbe b) en fonction du temps de réaction en heures pour la souche *Comamonas testosteroni* sp.

Les fig. 2a et 2b représentent les cartes de restriction des plasmides pXL2075 et pXL2076.

La fig. 3 représente la carte de restriction du fragment SstI-SstI de 4,1 kb contenant la séquence d'ADN (dénommée sur la figure "gène de la nitrilase") codant pour le polypeptide ayant l'activité nitrilase selon l'invention, fragment présent dans les plasmides pXL2075 et pXL2076. La stratégie d'élaboration du fragment XbaI-SstI contenant la séquence d'ADN selon l'invention est également représentée sur cette figure.

La fig. 4 représente la séquence d'ADN selon l'invention avec sa séquence d'acides aminés déduite.

La fig. 5 représente la carte de restriction du plasmide pXL2087.

La fig. 6 représente la carte de restriction du plasmide pXL2148.

La fig. 7 représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 10 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans la souche *E. coli* TG1/pXL2027. Chaque piste correspond à une quantité de protéine équivalente à 60 µl de culture à une densité optique à 610 nm de 3.

La fig. 8 représente la carte de restriction du plasmide pXL2158.

La fig. 9 représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 12,5 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans les souches TG1/pXL2158 et TG1/pXL2158 + pXL2035 (GroE).

La fig. 10 représente la carte de restriction du plasmide pXL 2169.

La fig. 11 représente l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE SDS à 10 % montrant l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention dans la souche *Pseudomonas putida* G2081 - pXL2169.

Les abréviations utilisées dans la suite de la description ont les significations ci-après :

SSC : tampon couramment utilisé pour des hybridations ; il contient du citrate de sodium et du NaCl. (20XSSC = NaCl 3M-citrate de sodium pH 7, 0,3 M)
 SDS : dodécylsulfate de sodium
 FPLC : chromatographie liquide dénommée en langue anglaise "fast protein liquid chromatography"
 SDS-PAGE : électrophorèse en gel à base de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide
 IPTG : isopropyl β-D thiogalactopyranoside.

EXEMPLES

EXEMPLE 1: PURIFICATION DE LA NITRILASE DE *Comamonas testosteroni* sp.

1 - PRÉPARATION DES CELLULES :

Une souche de *Comamonas testosteroni* sp a été cultivée, en fiole agitée, à 28°C, pendant 15 h 30, dans le milieu A dont la composition est la suivante : Milieu A

- Glucose	5 g/l
- (NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
- Na ₂ HPO ₄	5,24 g/l
- KHPO ₄	2,77 g/l
- Extrait de levure	5 g/l
- Casamino Acides	1 g/l

Cette préculture a servi à ensemer un fermenteur de 20 l contenant 15 l de milieu A. Le pH, la température, le débit d'air et la vitesse d'agitation ont été régulés respectivement à 6,6, 28°C, 300 l/h et 350 tr/min. Après 24 h, 84 g de cellules humides ont été récoltées. Cela correspond à une teneur en poids sec de cellules de 0,9 g/l et à une densité optique à 660 nm (DO_{660 nm}) de 2.

2 - DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE SUR ADIPONITRILE :

Un culot cellulaire contenant 13,1 mg de poids sec de cellules a été mis en suspension dans 2 ml d'une solution 52,3 mM en adiponitrile dans le tampon phosphate de potassium 50 mM ; pH 7. La réaction a été conduite à 25°C sous agitation et la cinétique a été suivie par prélèvement. Sur chaque prélèvement ont été dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) le cyano-5-valéramide, l'adipamide, le cyano-5-valérate, l'adipamate et l'adipate. Les résultats sont regroupés sur la fig. 1 qui représente les courbes de rendement (en ordonnées) en cyanovalérate (courbe a) et en adipate d'ammonium (courbe b). La vitesse de formation du cyanovalérate et de l'adipate était respectivement supérieure à 0,45 et égale à 0,15 U/mg de cellules poids sec (1 U est égale à 1 µmole de produit formé par minute).

3- PURIFICATION :

Toutes les étapes de la purification ont été réalisées dans le tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM de dithioérythritol (DTE) sauf indication contraire. A chacune des étapes, l'activité nitrilase des fractions a été déterminée à pH 7 et à 25°C dans le tampon phosphate 10 mM en présence d'adiponitrile 10 mM. La concentration en protéine des pools a été déterminée par la méthode au bleu de Coomassie (kit PIERCE Protein assay). Les protéines ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (Phastsystem PHARMACIA). Les modes opératoires de chacune des étapes sont commentés ci-dessous.

Etape 1 : Extrait brut

57 g de cellules humides ont été reprises dans 85 ml de tampon et traitées aux ultrasons pendant 30 min (Sonicateur VIBRACELL de Bioblock : Sonde 13 mm ; puissance 7 ; 40 % du cycle actif). La DO_{660 nm} est passée ainsi de 97 à 60. Après centrifugation à 48 000 g maximum pendant 60 min, le surnageant a été récupéré.

Ce surnageant a été amené, par adjonction progressive de sulfate d'ammonium, à 15 % de la saturation. Après 1 h, la suspension a été centrifugée 30 min à 30 000 g maximum. Le surnageant a été amené à 50 % de la saturation. Après 1 h, la suspension a été centrifugée dans les mêmes conditions, le précipité a été récupéré puis dialysé contre le tampon pendant deux jours.

Etape 2 : Colonne échangeuse d'ions (Q Sepharose Fast Flow)

La fraction dialysée a été chargée à un débit de 125 ml/h sur une colonne (26 x 380 mm) de "Q Sepharose

Fast Flow" équilibrée avec le tampon à un débit de 250 ml/h. La colonne a été percolée à un débit de 250 ml/h successivement par les solutions suivantes :

- 166 ml de tampon
- 180 ml d'un gradient 0 à 0,2 M en KCl dans le tampon
- 180 ml de tampon additionné de KCl 0,2 M
- 270 ml d'un gradient 0,2 à 0,4 M en KCl dans le tampon
- 180 ml de tampon additionné de KCl 0,4 M
- 200 ml de tampon additionné de KCl 1 M

La fraction ayant l'activité nitrilase a été éluée dans un volume de 129 ml au cours du palier à 0,2 M en KCl.

Les étapes suivantes sont réalisées sur le système FPLC (Pharmacia).

Etape 3 : filtration sur gel (FPLC Superdex 200)

La fraction ayant l'activité nitrilase obtenue précédemment (129 ml) a été concentrée jusqu'à 12 ml par précipitation des protéines avec du sulfate d'ammonium à 80 % de la saturation, suivie d'une dialyse contre le tampon. La fraction ainsi concentrée (12 ml) a été chargée en 2 fois sur la colonne de gel (16 x 600 mm) équilibrée avec le tampon additionné de 0,1 M de KCl à un débit de 0,8 ml/min. Les fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées avec le tampon ci-dessus à un débit de 1 ml/min et dans un volume total de 36 ml. Ces fractions correspondent à un poids moléculaire de 280 kDa.

Etape 4 : Colonne d'hydroxyapatite (BIO-RAD HPHT; 7,8 x 100 mm)

Les fractions obtenues ci-dessus ont été concentrées à 8 ml par ultrafiltration (membrane DIAFLO PM 39 AMICON). La solution concentrée a été injectée sur la colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec le tampon additionné de CaCl_2 , 10 μM . La colonne a été percolée, à un débit de 0,5 ml/min, successivement avec :

- 5 ml du tampon d'équilibrage,
- 15 ml d'un gradient de phosphate de potassium de 0 à 350 mM dans le tampon d'équilibrage,
- 10 ml du tampon d'équilibrage additionné de 350 mM de phosphate de potassium.

Les fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées entre 62 et 135 mM en phosphate de potassium sur un volume de 3 ml.

Etape 5 : Colonne d'interaction hydrophobe (FPLC-Phenyl Superose HR 5/5)

Les fractions actives obtenues ci-dessus, amenées à 15 % de la saturation en sulfate d'ammonium, ont été chargées à un débit de 0,5 ml/min sur la colonne, équilibrée avec du tampon contenant du sulfate d'ammonium à 15 % de la saturation. La colonne a été percolée avec :

- 6 ml de tampon d'équilibrage,
- 12 ml d'un gradient décroissant de sulfate d'ammonium 15 % à 0 % de la saturation en sulfate d'ammonium dans le tampon,
- 23 ml de tampon.

Une partie des fractions ayant l'activité nitrilase ont été éluées lors du lavage de la colonne avec le tampon d'équilibrage. Ces fractions actives ont été réinjectées dans les mêmes conditions. Cette opération a été effectuée deux fois. Les fractions actives, éluées après le gradient, ont été réunies (volume 51 ml).

Etape 6 : Filtration sur gel (FPLC-Superdex 200)

Les 51 ml ont été concentrés à 3 ml par ultrafiltration sur membrane (AMICON DIAFLO PM30). Ces 3 ml ont été chargés sur la colonne (16 x 600 mm), équilibrée avec le tampon additionné de 0,1 M KCl. Les 9 ml contenant l'activité ont été élués à une position correspondant à un poids moléculaire de 280 kDa. Cette solution a été amenée à 36 % de glycérol puis congelée pendant 15 jours.

Etape 7 : Colonne échangeuse d'ions (FPLC Mono Q HR 5/5)

La solution protéique a été décongelée et chargée sur la colonne, équilibrée avec le tampon contenant 0,1 M de KCl, à un débit de 0,5 ml/min. La colonne a été percolée successivement avec :

- 15 ml à 0,5 ml/min de tampon additionné de 0,1 M en KCl,
- 4,5 ml à 1 ml/min de tampon additionné de 0,1 M en KCl,

- 15 ml à 1 ml/min d'un gradient de KCl de 0,1 à 0,4 M dans le tampon,
- 10 ml de tampon additionné de 0,4 M de KCl.

Les fractions actives ont été éluées entre 0,15 et 0,3 M de KCl. Ces fractions sont homogènes. Par analyse SDS-PAGE, deux bandes très proches de 38 et 39 kDa sont visibles. Les fractions ainsi obtenues seront dénommées ci-après "nitrilase purifiée".

Les données de chacune des étapes de purification ci-dessus sont rassemblées dans le tableau 1 ci-après :

TABEAU 1 : PURIFICATION DE LA NITRILASE DE *Comamonas testosteroni* sp

ETAPE DE PURIFICATION	Vol. ml	Protéine mg	ACTIVITÉ		RENDEMENT		PF
			Totale	Spécifii	Protéine	Activité	
0 - Extrait brut	61	920	62 000	68	100	100	1
2 - Q Sepharose FF	130	245	47 000	190	27	76	2,8
3 - Filtration sur gel	36	27	56 000	2 100	2,9	90	30
4 - Colonne hydroxy-apatite	3	12	49 000	4 100	1,3	79	60
5 - Phényl Superose	51	11	11 000	1 000	1,1	18	15
6 - Filtration sur gel	9	2,7	6 300	2 300	0,3	10	34
7 - Mono Q HR5/5	2,9	1	1 200	1 200	0,01	2	18

ABRÉVIATIONS : PF = coefficient de purification ; U = $\mu\text{mol/h}$

4 - DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE N-TERMINALE DE LA NITRILASE

A partir de la protéine purifiée, la séquence N-terminale de 27 aminoacides a été déterminée par dégradation séquentielle automatique d'Edman en utilisant un appareil "Applied Biosystems Model 470 A". Cette séquence est la suivante :

Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Ala Val

5

10

15

Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr

20

25

La recherche dans les banques de séquences a permis de trouver une identité de 53 % avec la nitrilase de *Klebsiella pneumoniae* active sur le Bromoxynile, qui fait l'objet de la demande de brevet EP N° 373 173.

5 - ACTIVITÉ DE LA NITRILASE PURIFIÉE :

a) - Influence du pH sur l'activité de la nitrilase :

La nitrilase purifiée a été testée à différents pH sur deux substrats adiponitrile et cyano-5-valérate dans les conditions indiquées dans le tableau 2 ci-après.

TABEAU 2 : ACTIVITÉ DE LA NITRILASE PURIFIÉE EN FONCTION DU pH SUR ADIPONITRILE ET CYANOVALÉRATE

SUBSTRAT	TAMPON		ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE U/mg de protéine
	Nature	pH	
Adiponitrile	Acétate	3,0	2 300
	Acétate	4,0	2 900
	Acétate	4,5	2 800
	Acétate	5,0	2 700
	Phosphate	6,0	2 900
	Phosphate	7,0	2 700
	Phosphate	8,0	2 800
Cyano-5-valérate	Acétate	4,0	450
	Acétate	5,5	180
	Phosphate	7,0	30
	Phosphate	8,0	6

CONDITIONS COMMUNES : [substrat] = 10 mM ; tampon 10 mM ; T°C 25 ;
 [nitrilase] 12 µg/ml pour le cyanovalérate et 3 µg/ml pour l'adiponitrile (fraction étape 6) ;
 U (Adiponitrile) = µmole de cyanovalérate formé/h, U (cyanovalérate) = µmole d'adipate formé/h.

b) - Spectre d'activité de la nitrilase purifiée :

Les activités de la nitrilase purifiée ont été mesurées sur adiponitrile, cyano-5-valéramide, acide cyano-5-valérique, benzonitrile, propionitrile, acrylonitrile. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

TABEAU 3 : ACTIVITÉ RELATIVE DE LA NITRILASE PURIFIÉE SUR DIFFÉRENTS NITRILES

SUBSTRAT	ACTIVITÉ RELATIVE (%)
Adiponitrile	100
Cyano-5-valéramide	28
Acide cyano-5-valérique	22
Acrylonitrile	23
Propionitrile	6
Benzonitrile	4

CONDITIONS COMMUNES : tampon acétate : 10 mM pH 4 ; substrat 10 mM ; volume = 3 ml ; T = 25°C ;
durée de la réaction = 1 ou 3 h ; protéines : de 5 à 30 µg/ml.

EXEMPLE 2 : CLONAGE DE LA NITRILASE DE *Comamonas testosteroni* sp.

A partir de la séquence NH₂ terminale présentée dans l'exemple 1, une sonde nucléotidique a été synthétisée ; le pourcentage en GC élevé des souches de *Comamonas* décrites dans la littérature (Tamaoka et al., Int. J. Syst. Bacteriol, 1987, 37, 52-59) a dicté un choix pour la troisième position du codon dans le cas des lysines et dans le cas de la valine. La sonde est un 26 mer 128 fois dégénéré (N remplace A, C, G ou T) :

M K N Y P T V K V
5' ATGAAGAATT ATCCNACNGT CAAGGT 3'
C C G

La stratégie suivie a consisté tout d'abord à vérifier la spécificité de cette sonde nucléotidique et à déterminer la nature des fragments d'AdN génomique à cloner. Brièvement, l'AdN génomique de *Comamonas testosteroni* sp. a été digéré par plusieurs enzymes de restriction (SstI, SphI, BamHI, PstI...) correspondant à des sites utilisables pour le clonage.

Après électrophorèse sur gel d'agarose et transfert sur membrane de Nylon, les diverses digestions ont été hybridées à la sonde. On constate que la sonde a une spécificité suffisante dans les conditions d'hybridation utilisées (tampon d'hybridation = 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1 % SDS, 50 mM Na₃PO₄ pH 6,5, 250 µg/ml ssAdN ; température d'hybridation 50°C. Conditions de lavage : 1 h, 6x SSC, température ambiante et 5 min en 2x SSC, 0,1 % SDS à 50°C).

Dans ces conditions, la sonde a permis d'obtenir des signaux importants et sans ambiguïté ; en particulier, dans le cas des digestions par SstI, SphI, BamHI et PstI. Les empreintes d'hybridation montrent en particulier l'existence d'un fragment unique SstI-SstI d'environ 4 kb. Afin de cloner ce fragment, les fragments de 3,5 à 4,5 kb d'une digestion SstI de l'AdN génomique ont été purifiés par électrophorèse préparative sur agarose et électroélution, puis ligaturés au plasmide pUC19 (YANISCH et al., Gene 33 (1985)103), lui-même digéré par SstI. Après transformation dans la souche DH5α (Clontech Laboratory, Palo Alto Californie), 600 clones blancs sur LB amp X- gal (SAMBROOK et al., Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. 1989) ont été repiqués individuellement, transférés sur membrane de Nylon, puis analysés par hybridation avec la sonde ayant servi pour hybrider le

Southern blot et ce dans les mêmes conditions de stringence. Six clones ont ainsi été repérés comme hybridant très fortement avec la sonde. Deux clones ayant inséré le même fragment d'environ 4,1 kb dans les deux orientations (pXL2075 [fig. 2a] et pXL2076 [fig. 2b]) ont été analysés plus en détail (cartographie de restriction, séquençage partiel en utilisant la sonde comme amorce et Southern blot). Il a ainsi pu être montré que la partie 5' du gène qui hybride avec la sonde est localisée sur un fragment de XhoI-XbaI de 150 pb environ orienté dans le sens XhoI vers XbaI. Les fig. 2a et 2b représentent les cartes de restriction de ces plasmides.

EXEMPLE 3 : SÉQUENCE D'UN FRAGMENT DE 1194 pb CONTENANT L'AdN CODANT POUR LE POLYPEPTIDE AYANT L'ACTIVITÉ NITRILASE.

La localisation sur l'insert cloné du fragment de 1194 pb contenant le gène de la nitrilase séquencé est indiquée sur la fig. 3. La stratégie de séquençage de ce fragment réalisé selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier est également indiquée sur la fig. 3. Les diverses séquences ont toutes été obtenues par la méthode de terminaison de chaînes (kit sequenase en présence de 7-deaza dGTP ; $(^{35}\text{S})\text{dATP}$ soit sur des matrices simple brin de M13 (mp 18 ou 19, voir YANISCH et al., op. cité) recombinant portant des sous-fragments, soit directement sur le plasmide pXL2075). Plusieurs amorces spécifiques ont également été synthétisées dans ce but.

La séquence d'ADN selon l'invention est représentée sur la fig. 4. Le pourcentage en G+C moyen de la séquence obtenue est de 45,7 % ce qui est inférieur au pourcentage G+C de 61,5 % décrit chez d'autres souches de *Comamonas* (Tamaoka et al., op. cité). Une analyse de la séquence obtenue a permis de caractériser une phase ouverte de 1064 pb, appelée ci-après gène *nit*, codant pour un polypeptide de 354 résidus correspondant à un poids moléculaire de 38 725 Da. La séquence en acides aminés de ce polypeptide est indiquée sur la fig. 4. Ce polypeptide comprend la séquence NH_2 terminale utilisée pour synthétiser la sonde ainsi que trois séquences internes déterminées sur des fragments tryptiques de la nitrilase purifiée (ces séquences internes sont soulignées sur la fig. 4).

Ainsi, cette phase ouverte représente la séquence d'ADN selon l'invention.

EXEMPLE 4 : HOMOLOGIE AVEC D'AUTRES PROTÉINES, IDENTIFICATION DE SÉQUENCE HOMOLOGUE.

La séquence d'ADN selon l'invention a été comparée avec l'ensemble des séquences de la banque de protéines NBRF ; seule une homologie significative a été trouvée avec la Nitrilase de *Klebsiella ozaenae* spécifique de l'herbicide Bromoxynil (Stalker et al., J. Biol. Chem., 1988, 263, 6310-6314). Les deux nitrilases présentent une homologie stricte de 34,9 % répartie sur 320 acides aminés. Par ailleurs, cette protéine présente 34,4 % d'homologie stricte répartie sur 312 acides aminés avec la nitrilase d'*Arabidopsis* spécifique de l'indole-3-acétonitrile [Bartling & al., Eur. J. Biochem. 205, 417-424, 1992].

EXEMPLE 5 : EXPRESSION DE LA NITRILASE DANS *E. Coli*.

Afin de confirmer l'identification de la phase codante avec la nitrilase purifiée, le gène *nit*, précédé de son propre site de fixation des ribosomes, a été placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose de *E. coli* selon le mode opératoire décrit ci-après : le plasmide pXL2087, décrit sur la fig. 5, a été obtenu par insertion du fragment XhoI-NcoI dérivé du plasmide pXL2075 entre les sites correspondants du vecteur pMTL25 (Chambers et al., Gene, 1988, 68, 139-149). Ce plasmide contient donc le promoteur de l'opéron lactose Plac, suivi du site de fixation des ribosomes et du gène structural de la nitrilase, ainsi qu'un gène conférant la résistance à l'ampicilline.

L'expression de la nitrilase a été visualisée chez la souche *E. coli* TG1 contenant le plasmide pXL2087. Dans ce but, la souche TG1/pXL2087, ainsi que la souche témoin TG1/pUC19, ont été cultivées 16 h en milieu LB à 37°C (Miller, J.H. 1972, Experiments in Molecular Genetics - Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, puis diluées au 100ème dans le même milieu et à la même température. Lorsque les cultures ont atteint une DO_{610} comprise entre 0,5 et 1, de l'IPTG, à la concentration finale de 1 mM a été ajouté. Après 2 h de culture, les bactéries ont été collectées.

L'expression de la nitrilase a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE, dans la fraction brute ou après centrifugation dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la fig. 7 et montrent un niveau élevé d'expression de la nitrilase dans les extraits de cellules cultivées en présence d'IPTG ; toutefois, cette protéine est essentiellement sous forme insoluble.

Sur la fig. 7, M représente le marqueur de poids moléculaires ; ceux-ci sont indiqués en kDa. D'autre part, les pistes ont les significations ci-après :

	TG1 + pUC19	TG1 + pUC19 + IPTG	TG1 + pXL2087	TG1 + pXL2087 + IPTG
Fractions brutes	A	D	G	J
Culots	B	E	H	K
Surnageants	C	F	I	L

A partir du plasmide pXL2087, on a préparé le plasmide pXL2148 par insertion du fragment XhoI-EcoRI du plasmide pXL2087, portant le gène codant pour la nitrilase entre les sites Sall et EcoRI de pBR322 [SUTCLIFFE, Nucleic Acid Res. 5, (1978): 2721-2730].

Ce plasmide pXL2148, dont la carte de restriction est représentée sur la fig. 6, a été également utilisé pour transformer la souche de *E. coli* TG1 selon la méthode du chlorure de calcium. La sélection des micro-organismes a été faite sur ampicilline. La souche *E. coli* TG1 (pXL2048) (G4207) ainsi transformée a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes à Paris (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux) sous le n° I-1242 le 21 juillet 1992.

D'autres systèmes d'expression ont été utilisés pour produire la nitrilase dans un micro-organisme recombinant.

Tout d'abord, le gène *nit* a été exprimé dans *E. coli* derrière le promoteur de l'opéron tryptophane de *E. coli*, sous la dépendance du RBS du gène CII du phage λ . Pour ce faire, un site de restriction NdeI a été créé sur le codon d'initiation de *nit* et le fragment NdeI/AhaII de 117 pb contenant la partie 5' du gène *nit* a été amplifié par la technique de PCR, à partir de pXL2087. Un fragment NdeI/XbaI de 61 pb, obtenu après digestion du premier fragment, a été ligué au fragment EcoRI/NdeI contenant le promoteur de l'opéron tryptophane de *E. coli* et le site de fixation des ribosomes du gène CII du bactériophage λ (Ptrp-RBSCII) entre les sites EcoRI et XbaI de pUC19 (Yanisch et al., Gene 33 (1985) 103) pour aboutir au plasmide pXL2149. Le fragment EcoRI/XbaI de pXL2149, contenant la partie 5' de *nit* derrière Ptrp-RBSCII, a été ligué avec le fragment XbaI/Sall de pXL2087 contenant la partie 3' du gène *nit* entre les sites EcoRI et Sall de pXL642 (Mayaux, résultats non publiés) : pXL642 est un dérivé de pXL534 (Latta et al., 1990. DNA Cell Biol., 9, 129) dans lequel le gène surexprimé code pour un inhibiteur tissulaire de métallo-proteases et dans lequel le site HindIII en aval du gène surexprimé a été remplacé par le multisite EcoRI/HindIII de M13mp18.

Le plasmide pXL2158 final est donc un dérivé de pBR322 (Sutcliffe, Nucleic Acid Res. 5, (1978) : 2721) contenant un gène conférant la résistance à l'ampicilline et le gène *nit* sous contrôle de Ptrp-RBSCII. La carte de restriction de ce plasmide pXL2158 est représentée à la fig. 8.

Le plasmide pXL2158 a été utilisé pour transformer la souche *E. coli* TG1. La souche TG1/pXL2158, ainsi que la souche témoin TG1 contenant le vecteur pMTL22, ont été cultivées 16 h en milieu M9 glucose à 30°C (Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) contenant 100 μ g/ml d'ampicilline et 100 μ g/ml de tryptophane. Ces cultures ont été diluées 100 fois dans le même milieu en absence de tryptophane et cultivées pendant 6 heures à la même température.

L'expression de la nitrilase de *Comamonas testosteroni* NI 1 a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE 12,5%, dans la fraction brute ou, après centrifugation, dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la fig. 9.

	TG1/pXL2158 + pXL2035	TG1/pXL2158	TG1 + pMTL22
Surnageant	A	D	G
Culot	B	E	H
Extrait total	C	F	I

On voit sur ce gel que pXL2158 induit une forte expression de la nitrilase majoritairement sous forme insoluble.

L'efficacité de la chaperone GroE a été alors testée (Hemmingsen et al., 1988. Nature. 333 : 330) pour aider au repliement correct de la nitrilase. Pour ce faire, le plasmide pXL2035 a été construit de la manière suivante. Le fragment EcoRI/HindIII de 2,2 kb contenant les gènes groES et groEL, codant pour les deux sous-unités de GroE, a été extrait du plasmide pOF39 (Fayet et al., 1986. Mol. Gen. Genet. 202: 435) et introduit entre les sites EcoRI et HindIII du vecteur pDSK519 (Keen et al., 1988. Gene. 70 : 191).

Le plasmide pXL2035 a été introduit dans la souche TG1 contenant pXL2158. La souche résultante a été cultivée dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de kanamycine 50 mg/l ; les résultats d'expression sont visualisés sur la fig. 9. Il ressort que la surexpression de GroE (seule la sous-unité GroEL est visible sur le gel) solubilise une majorité de la nitrilase exprimée à partir de pXL2158.

Le même système d'expression a été utilisé pour produire la nitrilase chez *Pseudomonas putida*. Ainsi, à partir de pXL2158, les fragments NdeI/NcoI de 1256 pb et NcoI/BamHI de 535 pb ont été introduits entre les sites NdeI et BamHI de pXL1841. pXL1841 (Blanche et al., 1991. J. Bacteriol. 173:4637) est un dérivé de pKT230 (Bagdasarian et al., 1981. Gene. 15: 237) exprimant un gène de *Methanobacterium ivanovii* derrière P_{trp}-RBSCII.

Le plasmide pXL2169 final est donc un dérivé de pKT230 contenant un gène conférant la résistance à la kanamycine et le gène nit sous contrôle de P_{trp}-RBSCII (cf fig. 10). Ce plasmide a été introduit dans la souche de *Pseudomonas putida* G2081. G2081 est une dérivée de *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian and Timmis, 1981. In Hofschneid and Goebel. Topics in Microbiology and Immunology. 47. Springer Verlag. Berlin.) rendue résistante à l'acide nalidixique et à la rifampicine. Le vecteur pDSK519 (Keen et al., 1988, Gene. 70 191) a été utilisé comme plasmide témoin. G2081 (pXL2169) et la souche G2081 (pDSK519) ont été cultivées la nuit à 30°C en milieu LB contenant 20 mg/l de kanamycine. Ces précultures ont été diluées 100 fois dans le même milieu. Les cultures ont alors été poursuivies 7 h 30 min à la même température. L'expression de la nitrilase de *Comamonas testosteroni* NI 1 a été mesurée, après sonication des cellules, en gel SDS-PAGE 10 %, dans la fraction brute ou, après centrifugation, dans le culot et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sur la fig. 11. Seul l'extrait brut de la souche G2081 (pDSK519) a été déposé (puits D). Pour la souche G2081 (pXL2169) l'extrait total, le culot de sonication et le surnageant de sonication ont été déposés, respectivement, dans les puits C, B et A. Il ressort de cette expérience que la souche de *Pseudomonas putida* exprime des quantités importantes de nitrilase sous forme soluble.

EXEMPLE 6 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ NITRILASE DE SOUCHES RECOMBINANTES.

Les exemples qui suivent illustrent l'activité nitrilase des souches recombinantes de *E. coli* TG1 et de *Pseudomonas putida* G2081.

Les différents plasmides intégrés dans ces souches sont les suivants.

PLASMIDES

CARACTÉRISTIQUES

pXL2087	Plasmide recombiné qui porte le gène de la nitrilase de <i>Comamonas</i> NI 1 sous le contrôle du promoteur P _{lac} .
pXL2158	Plasmide recombiné qui porte le gène de la nitrilase de <i>Comamonas</i> NI 1 sous le contrôle du promoteur tryptophane.
pXL2035	Plasmide recombiné qui porte les gènes codant pour GroE et S.
pXL2169	Plasmide à large spectre d'hôte avec une insertion porteur du gène de la nitrilase de <i>Comamonas</i> NI 1 sous le contrôle de P _{trp} .
pDSK519	Plasmide témoin (cf. page 21 ligne 6).

Les activités de ces souches, induites ou non, sont mesurées sur adiponitrile et cyano-5-valérate, à différents pH et comparées aux souches témoins négatif : *E. coli* TG1, *E. coli* TG1 (pXL2035) et *Pseudomonas putida* G2081.

5 1 - PRÉPARATION DES CELLULES :

Les cultures sont réalisées dans les conditions décrites dans le tableau 4. Au cours de la phase exponentielle de croissance, une des deux cultures de la souche recombinante est induite par l'IPTG 1 mM ; après 2 h à 37°C, cette culture est traitée.

10 **TABLEAU 4 : CULTURE DES SOUCHES**

MICRO-ORGANISMES	MILIEU	DO _{660nm}	PS (g/l)
1 - <i>E. coli</i> TG1	a	3,1	0,90
2 - <i>E. coli</i> (pXL2087)	b	3,2	0,90
3 - <i>E. coli</i> (pXL2087)	c	2,5	0,90
4 - <i>E. coli</i> (pXL2035)	d	2,1	0,90
5 - <i>E. coli</i> (pXL2148) ⁽¹⁾	b	3,1	0,80
6 - <i>E. coli</i> (pXL2035, 2158) ⁽²⁾	e	4,2	1,30
7 - <i>P. putida</i> (pXL1289)	d	2,1	0,98
8 - <i>P. putida</i> (pXL2169)	d	2,3	0,98

35 **ABRÉVIATIONS :** a : milieu LB ; b : milieu LB + Amp 100 µg/ml ; c : milieu b + ajout de IPTG 1 mM à une DO_{660nm} = 1 ; d : milieu LB + kanamycine 50 mg/l ; e : milieu M9 + ampicilline 100 mg/l + kanamycine 50 mg/l ; PS : poids sec.

CONDITIONS COMMUNES : 1 à 3 : Ensemencement au 1/100ème à partir d'une préculture âgée de 16 h ; temps de culture 5,75 h ; T°C 37.

40 4 à 8 : Ensemencement au 1/100ème à partir d'une préculture âgée de 17 h à 37° C avec addition de tryptophane ; temps de culture en fermenteur de 15 l : 23 h pour *E. Coli* et 7,5 h pour *P. putida* ; T°C 30.

45 2 - MESURES DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES :

Les conditions de mesures des activités spécifiques et les résultats sont répertoriés dans le tableau 5.

TABLEAU 5 : DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS DES SOUCHES TÉMOINS DES SOUCHES RECOMBINANTES

MICRO-ORGANISME			CONDITIONS OPÉRATOIRES				Activité U mg de PS
Nature	IPTG	Etat	Substrat	[PS] (g/l)	Volumé (ml)	pH	
1 - <i>E. coli</i> TG1	-	E	CVA	15,5	1	5,2	0
	-	E	CVA	15,5	1	7,0	0
	-	E	AdN	15,5	1	5,2	0
	-	E	AdN	15,5	1	7,0	0

MICRO-ORGANISME			CONDITIONS OPÉRATOIRES				Activité U mg de PS
Nature	IPTG	Etat	Substrat	[PS] (g/l)	Volume (ml)	pH	
2 - <i>E. coli</i> TG1 pXL2087	+	E	CVA	1,4	1	4,0	28
	+	E	CVA	1,4	1	5,2	27
	+	E	CVA	1,4	2	7,0	8
	+	S	CVA	1,4	1	5,2	25
	+	S	CVA	1,4	2	7,0	8
	+	E	AdN	0,3	1	4,2	159(a)
	+	E	AdN	1,4	1	4,3	38
	+	E	AdN	1,4	2	6,2	18
	+	E	AdN	1,4	2	7,0	11
	+	S	AdN	1,4	2	6,2	17
	+	S	AdN	1,4	2	7,0	10
3 - <i>E. coli</i> TG1 pXL2087	-	E	CVA	1,2	2	4,0	10
	-	E	CVA	1,2	2	5,2	14
	-	E	CVA	1,2	2	7,0	3,4
	-	S	CVA	1,0	1	5,2	13
	-	S	CVA	1,0	1	7,0	3,2
	-	E	AdN	0,3	1	4,2	75(a)
	-	E	AdN	1,2	2	4,3	16
	-	E	AdN	1,2	2	6,2	11
	-	E	AdN	1,2	2	7,0	3,4
	-	S	AdN	1,0	1	6,2	3
	-	S	AdN	1,0	1	7,0	4
4 - <i>E. coli</i> TG1 pXL2035	-	E	AdN	0,06	1	7,0	Ua = 0 Ub = non déterminé
	-	E	AdN	0,24	1	7,0	Ua = 270 Ub = -
5 - <i>E. coli</i> TG1 pXL2168	-	E	CVA	1,25	1	7,0	Ua = - Ub = 8,3

MICRO-ORGANISME			CONDITIONS OPÉRATOIRES				Activité U mg de PS
Nature	IPTG	Etat	Substrat	[PS] (g/l)	VOLUME (ml)	pH	
6 - <i>E. coli</i> TG1 pXL2035, 2158	-	E	AdN	0,06	1	7,0	Ua = 1 500 Ub = -
			CVA	0,2	1	7,0	Ua = - Ub = 70
7 - <i>P. putida</i> G2081 pDSK519	-	E	AdN	0,3	1	7,0	Ua = 0 Ub = -
8 - <i>P. putida</i> G2081 pXL2169	-	E	CVA	0,25	1	7,0	Ua = 130 Ub = -

CONDITIONS COMMUNES : [substrat] = 50 mM ; T°C = 25 ; tampon 50 mM ; cinétique sur 90 min pour 1 à 3 et sur 120 min pour 4 à 8.

ABRÉVIATIONS : E : cellules entières ; S : cellules soniquées ; U : 1 μ mol d'adipate produit/h sauf (a) 1 μ mol de cyano-5-valérate produit/h ; Ua = μ moles de cyanovalérate produit/h/mg de cellules PS ; Ub = μ moles d'adipate produit/h/mg de cellules sèches ; AdN : adiponitrile ; CVA : cyano-5-valérate. PS : poids sec.

EXEMPLE 7 : SYNTHÈSE D'ADIPATE D'AMMONIUM PAR HYDROLYSE D'ADIPONITRILE EN BATCH PAR *E. coli* (pXL2087) EN SUSPENSION.

Dans un volume initial de 5 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7 contenant la souche *E. coli* (pXL2087) à une concentration initiale de 21 g/l, on a ajouté à 25°C et sous agitation magnétique 120 μ l ou 1 068 μ moles d'adiponitrile à 0, 1, 2, 3, 5, 6 et 7 h de réaction. Le suivi analytique a été assuré par prélèvements de 100 μ l du volume réactionnel toutes les heures. On a constaté que l'hydrolyse se fait sans perte notable de la cinétique.

Les activités moyennes calculées sur 30 min après ajout de l'adiponitrile sont rassemblées dans le tableau 6 ci-après.

TABEAU 6 : ACTIVITÉS MOYENNES DES CELLULES E. COLI (PXL2087) AU COURS DE L'HYDROLYSE DE L'ADIPONITRILE

TEMPS DE RÉACTION (h)	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE μ mole d'adipate h x mg de cellules
0,5	16
2,5	15
5,5	11
6,5	11
7,7	15

EXEMPLE 8 : SYNTHÈSE D'ADIPATE D'AMMONIUM PAR HYDROLYSE DE L'ADIPONITRILE EN RÉACTEUR À LIT FIXE PAR *E. coli* (pXL2087) IMMOBILISÉE SUR RÉSINE.

Les cellules d'*E. coli* (pXL2087) ont tout d'abord été fixées selon la technique décrite dans le brevet U.S. 4 732 851.

Le biocatalyseur résultant a ensuite été utilisé en colonne à lit fixe pour l'hydrolyse de l'adiponitrile en adipate d'ammonium.

1 - FIXATION DE *E. coli* (pXL2087) SUR RÉSINE.

Les cellules ont été fixées selon le protocole suivant :

- 1 g (poids humide) de *E. coli* (pXL2087) à 22 % de matières sèches,
- 1 g de polyazétidine POLYCUP,
- 1 g de résine DUOLITE A 171.

Le gramme de cellules a été mis en suspension dans la solution de polyazétidine. Après homogénéisation, la résine a été coulée dans la suspension cellulaire. L'ensemble a été agité à la spatule puis abandonné pendant 18 h, à l'air libre, sous une hotte, pour séchage. On a recueilli ainsi 4 ml ou 1,3 g de biocatalyseur.

Les activités des cellules immobilisées et libres ont été déterminées, à 25°C pH 7 sur une solution d'adiponitrile 50 mM. Elles sont respectivement de 30 et 110 μ moles de cyano-2-valérate/h/mg de cellules PS. On en déduit un rendement de fixation de 26 %.

2 - Hydrolyse de l'adiponitrile en réacteur à lit fixe :

La détermination du temps de demi-vie est réalisée en réacteur à lit fixe, continûment alimenté dans les conditions indiquées ci-après :

T°C 28 ; Catalyseur 0,5 g ou 2 ml ou 85 mg de cellules (poids sec) ; [adiponitrile] 50 mM ; tampon phosphate 50 mM pH 7 ; débit 3,7 +/- 0,1 ml/h ; colonne : diamètre 1 cm, hauteur 3 cm.

L'activité initiale des cellules était de 1,5 μ moles d'adipate/h/mg de cellules (poids sec). 66 % de l'activité initiale sont conservés après 32 jours ou 770 h.

APPENDICE I

5

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

10

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC CHIMIE

(B) RUE: 25, Quai Paul Doumer

15

(C) VILLE: Courbevoie

(E) PAYS: France

(F) CODE POSTAL: 92400

(G) TELEPHONE: 47 68 12 34

20

(H) TELECOPIE: 47 68 16 56

(ii) TITRE DE/L' INVENTION: Polypeptides possédant une activité
nitrilase, séquence d'ADN codant pour lesdits
polypeptides, cassettes d'expression et micro-organismes
hôtes permettant leur obtention, procédé de
transformation des nitriles en carboxylates au
moyen desdits polypeptides.

25

30

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

35

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

40

(v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

NUMERO DE DEPOT: EP 93 420334.0

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE DEPOT: FR 92 09882

(B) DATE DE DEPOT: 10-AUG-1992

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

50

(A) LONGUEUR: 32 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

5

Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Ala Val

1 5 10 15

10

Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr Thr Lys Leu Ile Ala

20 25 30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 9 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

25

(B) CLONE: séquence déduite de la sonde SEQ ID NO:3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val

30

1 5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

40

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

45

(iii) ANTI-SENS: NON

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

50

(B) CLONE: sonde

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATGAAGAAAT AYCCNACNGT SAAGGT

55

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1194 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

- (B) CLONE: sequence codant pour un polypeptide
 possédant une activité nitrilase

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMLACEMENT: 87..1148

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CTCGAGACAA AATTGGGACA GTCGCCCCCT ATCTGCAAAA TGGAACCTCC TTTGCACATC	60
TATAAAATTT TTTGAGGAAG ACAGCA ATG AAA AAT TAT CCT ACA GTC AAG GTA	113
Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val	
1 5	
GCA GCA GTG CAA GCT GCT CCT GTA TTT ATG AAT CTA GAG GCA ACA GTA	161
Ala Ala Val Gln Ala Ala Pro Val Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val	
10 15 20 25	
GAT AAA ACT TGT AAG TTA ATA GCA GAA GCA GCA TCT ATG GGC GCC AAG	209
Asp Lys Thr Cys Lys Leu Ile Ala Glu Ala Ala Ser Met Gly Ala Lys	
30 35 40	
GTT ATC GGC TTC CCA GAA GCA TTT ATT CCC GGC TAT CCA TAT TGG ATT	257
Val Ile Gly Phe Pro Glu Ala Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ile	
45 50 55	
TGG ACA TCA AAT ATG GAC TTC ACT GGA ATG ATG TGG GCC GTC CTT TTC	305
Trp Thr Ser Asn Met Asp Phe Thr Gly Met Met Trp Ala Val Leu Phe	
60 65 70	

5	AAG AAT GCG ATT GAA ATC CCA AGC AAA GAA GTT CAA CAA ATT AGT GAT Lys Asn Ala Ile Glu Ile Pro Ser Lys Glu Val Gln Gln Ile Ser Asp 75 80 85	353
10	GCT GCA AAA AAG AAT GGA GTT TAC GTT TGC GTT TCT GTA TCA GAG AAA Ala Ala Lys Lys Asn Gly Val Tyr Val Cys Val Ser Val Ser Glu Lys 90 95 100 105	401
15	GAT AAT GCC TCG CTA TAT TTG ACG CAA TTG TGG TTT GAC CCG AAT GGT Asp Asn Ala Ser Leu Tyr Leu Thr Gln Leu Trp Phe Asp Pro Asn Gly 110 115 120	449
20	AAT TTG ATT GGC AAG CAC AGG AAA TTC AAG CCC ACT AGT AGT GAA AGA Asn Leu Ile Gly Lys His Arg Lys Phe Lys Pro Thr Ser Ser Glu Arg 125 130 135	497
25	GCT GTA TGG GGA GAT GGG GAT GGA AGC ATG GCT CCC GTA TTT AAA ACA Ala Val Trp Gly Asp Gly Asp Gly Ser Met Ala Pro Val Phe Lys Thr 140 145 150	545
30	GAG TAT GGG AAT CTT GGG GGA CTC CAG TGC TGG GAA CAT GCT CTC CCA Glu Tyr Gly Asn Leu Gly Gly Leu Gln Cys Trp Glu His Ala Leu Pro 155 160 165	593
35	TTA AAC ATT GCG GCG ATG GGC TCA TTG AAC GAA CAG GTA CAT GTT GCT Leu Asn Ile Ala Ala Met Gly Ser Leu Asn Glu Gln Val His Val Ala 170 175 180 185	641
40	TCC TGG CCA GCC TTC GTC CCT AAA GGC GCA GTA TCA TCC AGA GTA TCA Ser Trp Pro Ala Phe Val Pro Lys Gly Ala Val Ser Ser Arg Val Ser 190 195 200	689
45	TCC AGC GTC TGT GCG TCT ACT AAT GCG ATG CAT CAG ATC ATT AGT CAG Ser Ser Val Cys Ala Ser Thr Asn Ala Met His Gln Ile Ile Ser Gln 205 210 215	737
50	TTT TAC GCG ATC AGC AAT CAG GTA TAT GTA ATT ATG TCA ACC AAT CTC Phe Tyr Ala Ile Ser Asn Gln Val Tyr Val Ile Met Ser Thr Asn Leu 220 225 230	785
55	GTT GGC CAA GAC ATG ATT GAC ATG ATT GGG AAA GAT GAA TTT TCC AAA Val Gly Gln Asp Met Ile Asp Met Ile Gly Lys Asp Glu Phe Ser Lys 235 240 245	833

5	AAC TTT CTA CCG CTT GGT TCT GGA AAC ACA GCG ATT ATT TCT AAC ACC Asn Phe Leu Pro Leu Gly Ser Gly Asn Thr Ala Ile Ile Ser Asn Thr 250 255 260 265	881
10	GGT GAG ATT TTG GCA TCA ATT CCA CAA GAC GCG GAG GGA ATT GCT GTT Gly Glu Ile Leu Ala Ser Ile Pro Gln Asp Ala Glu Gly Ile Ala Val 270 275 280 .	929
15	GCA GAG ATT GAC CTT AAC CAA ATA ATT TAT GGA AAG TGG TTA CTG GAT Ala Glu Ile Asp Leu Asn Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Trp Leu Leu Asp 285 290 295	977
20	CCC GCC GGT CAT TAC TCT ACT CCC GGC TTC TTA AGT TTG ACA TTT GAT Pro Ala Gly His Tyr Ser Thr Pro Gly Phe Leu Ser Leu Thr Phe Asp 300 305 310	1025
25	CAG TCT GAA CAT GTA CCC GTA AAA AAA ATA GGT GAG CAG ACA AAC CAT Gln Ser Glu His Val Pro Val Lys Lys Ile Gly Glu Gln Thr Asn His 315 320 325	1073
30	TTC ATC TCT TAT GAA GAC TTA CAT GAA GAT AAA ATG GAT ATG CTA ACG Phe Ile Ser Tyr Glu Asp Leu His Glu Asp Lys Met Asp Met Leu Thr 330 335 340 345	1121
35	ATT CCG CCG AGG CGC GTA GCC ACA GCG TGATCGCCGC CTCTCGGGGC Ile Pro Pro Arg Val Ala Thr Ala 350	1168
40	GTTCGGTTGC TGATAGCCAT CGCCTT	1194

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 354 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

50	Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Ala Pro 1 5 10 15 Val Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr Cys Lys Leu Ile 20 25 30
----	---

55

	Ala	Glu	Ala	Ala	Ser	Met	Gly	Ala	Lys	Val	Ile	Gly	Phe	Pro	Glu	Ala	
				35					40					45			
5	Phe	Ile	Pro	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Trp	Ile	Trp	Thr	Ser	Asn	Met	Asp	Phe	
			50				55						60				
	Thr	Gly	Met	Met	Trp	Ala	Val	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile	Glu	Ile	Pro	
		65				70					75				80		
10	Ser	Lys	Glu	Val	Gln	Gln	Ile	Ser	Asp	Ala	Ala	Lys	Lys	Asn	Gly	Val	
					85						90				95		
	Tyr	Val	Cys	Val	Ser	Val	Ser	Glu	Lys	Asp	Asn	Ala	Ser	Leu	Tyr	Leu	
				100					105					110			
15	Thr	Gln	Leu	Trp	Phe	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn	Leu	Ile	Gly	Lys	His	Arg	
			115					120					125				
	Lys	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ser	Glu	Arg	Ala	Val	Trp	Gly	Asp	Gly	Asp	
20			130					135					140				
	Gly	Ser	Met	Ala	Pro	Val	Phe	Lys	Thr	Glu	Tyr	Gly	Asn	Leu	Gly	Gly	
		145				150					155				160		
25	Leu	Gln	Cys	Trp	Glu	His	Ala	Leu	Pro	Leu	Asn	Ile	Ala	Ala	Met	Gly	
				165						170					175		
	Ser	Leu	Asn	Glu	Gln	Val	His	Val	Ala	Ser	Trp	Pro	Ala	Phe	Val	Pro	
				180					185					190			
30	Lys	Gly	Ala	Val	Ser	Ser	Arg	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Cys	Ala	Ser	Thr	
			195					200					205				
	Asn	Ala	Met	His	Gln	Ile	Ile	Ser	Gln	Phe	Tyr	Ala	Ile	Ser	Asn	Gln	
35			210				215						220				
	Val	Tyr	Val	Ile	Met	Ser	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Gln	Asp	Met	Ile	Asp	
		225				230					235				240		
40	Met	Ile	Gly	Lys	Asp	Glu	Phe	Ser	Lys	Asn	Phe	Leu	Pro	Leu	Gly	Ser	
				245					250					255			
	Gly	Asn	Thr	Ala	Ile	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Glu	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	
			260					265					270				
45	Pro	Gln	Asp	Ala	Glu	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Gln	
			275					280					285				
	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Trp	Leu	Leu	Asp	Pro	Ala	Gly	His	Tyr	Ser	Thr	
		290					295					300					
50	Pro	Gly	Phe	Leu	Ser	Leu	Thr	Phe	Asp	Gln	Ser	Glu	His	Val	Pro	Val	
		305				310					315				320		
	Lys	Lys	Ile	Gly	Glu	Gln	Thr	Asn	His	Phe	Ile	Ser	Tyr	Glu	Asp	Leu	
55						325					330				335		

His Glu Asp Lys Met Asp Met Leu Thr Ile Pro Pro Arg Arg Val Ala

340

345

350

Thr Ala

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Revendications

1 - Séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase, capable d'hydrolyser les nitriles en carboxylates,

caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

- la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase telle que représentée sur la fig. 4,
- un analogue de cette séquence résultant de la dégénérescence du code génétique,
- une séquence d'ADN hybridant avec l'une de ces séquences ou un fragment de celles-ci et codant pour un polypeptide ayant une activité nitrilase.

2 - Séquence d'ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence nucléotidique suivante :

CTCGAGACAA	AATTGGGACA	GTGCCCCCT	ATCTGCAAAA	TGGAACCTCC	TTTGACATC	60
TATAAAATTT	TTTGAGGAAG	ACAGCAATGA	AAAATTATCC	TACAGTCAAG	GTAGCAGCAG	120
TGCAAGCTGC	TCCTGTATTT	ATGAATCTAG	AGGCAACAGT	AGATAAACT	TGTAAGTTAA	180
TAGCAGAAGC	AGCATCTATG	GGCGCCAAGG	TTATCGGCTT	CCCAGAAGCA	TTTATTCCTG	240
GCTATCCATA	TTGGATTTGG	ACATCAAATA	TGGACTTCAC	TGGAATGATG	TGGGCCGTCC	300
TTTTCAAGAA	TGCGATTGAA	ATCCCAAGCA	AAGAAGTTCA	ACAAATTAGT	GATGCTGCAA	360
AAAAGAATGG	AGTTTACGTT	TGCGTTTCTG	TATCAGAGAA	AGATAATGCC	TCGCTATATT	420
TGACGCAATT	GTGGTTTGAC	CCGAATGGTA	ATTTGATTGG	CAAGCACAGG	AAATTCAAGC	480
CCACTAGTAG	TGAAAGAGCT	GTATGGGGAG	ATGGGGATGG	AAGCATGGCT	CCCGTATTTA	540
AAACAGAGTA	TGGGAATCTT	GGGGGACTCC	AGTGCTGGGA	ACATGCTCTC	CCATTAAACA	600
TTGCGGCGAT	GGGCTCATTG	AACGAACAGG	TACATGTTGC	TTCTGGCCA	GCCTTCGTCC	660
CTAAAGGCGC	AGTATCATCC	AGAGTATCAT	CCAGCGTCTG	TGCGTCTACT	AATGCGATGC	720
ATCAGATCAT	TAGTCAGTTT	TACGCGATCA	GCAATCAGGT	ATATGTAATT	ATGTCAACCA	780
ATCTCGTTGG	CCAAGACATG	ATTGACATGA	TTGGGAAAGA	TGAATTTTCC	AAAACTTTC	840
TACCGCTTGG	TTCTGGAAAC	ACAGCGATTA	TTTCTAACAC	CGGTGAGATT	TTGGCATCAA	900
TTCCACAAGA	CGCGGAGGGA	ATTGCTGTTG	CAGAGATTGA	CCTTAACCAA	ATAATTTATG	960
GAAAGTGGTT	ACTGGATCCC	GCCGGTCATT	ACTCTACTCC	CGGCTTCTTA	AGTTTGACAT	1020
TTGATCAGTC	TGAACATGTA	CCCGTAAAAA	AAATAGGTGA	GCAGACAAAC	CATTTTCATCT	1080
CTTATGAAGA	CTTACATGAA	GATAAAATGG	ATATGCTAAC	GATTCCGCCG	AGGCGCGTAG	1140
CCACAGCGTG	ATCGCCGCCT	CTCGGGGCGT	TCGGTTGCTG	ATAGCCATCG	CCTT	1194

3 - Polypeptides résultant de l'expression d'une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 ou 2, et possédant une activité nitrilase.

4 - Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 5 Val Phe Met Asn L u Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr Cys Lys Leu Ile
 20 25 30
 Ala Glu Ala Ala Ser Met Gly Ala Lys Val Ile Gly Phe Pro Glu Ala
 35 40 45
 10 Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ile Trp Thr Ser Asn Met Asp Phe
 50 55 60
 Thr Gly Met Met Trp Ala Val Leu Phe Lys Asn Ala Ile Glu Ile Pro
 15 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Val Gln Gln Ile Ser Asp Ala Ala Lys Lys Asn Gly Val
 85 90 95
 20 Tyr Val Cys Val Ser Val Ser Glu Lys Asp Asn Ala Ser Leu Tyr Leu
 100 105 110
 Thr Gln Leu Trp Phe Asp Pro Asn Gly Asn Leu Ile Gly Lys His Arg
 115 120 125
 25 Lys Phe Lys Pro Thr Ser Ser Glu Arg Ala Val Trp Gly Asp Gly Asp
 130 135 140
 Gly Ser Met Ala Pro Val Phe Lys Thr Glu Tyr Gly Asn Leu Gly Gly
 30 145 150 155 160
 Leu Gln Cys Trp Glu His Ala Leu Pro Leu Asn Ile Ala Ala Met Gly
 165 170 175
 35 Ser Leu Asn Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Phe Val Pro
 180 185 190
 Lys Gly Ala Val Ser Ser Arg Val Ser Ser Ser Val Cys Ala Ser Thr
 195 200 205
 40 Asn Ala Met His Gln Ile Ile Ser Gln Phe Tyr Ala Ile Ser Asn Gln
 210 215 220
 Val Tyr Val Ile Met Ser Thr Asn Leu Val Gly Gln Asp Met Ile Asp
 45 225 230 235 240
 Met Ile Gly Lys Asp Glu Phe Ser Lys Asn Phe Leu Pro Leu Gly Ser
 245 250 255
 50
 55

Gly Asn Thr Ala Ile Ile Ser Asn Thr Gly Glu Ile L u Ala Ser Ile
 260 265 270
 5 Pro Gln Asp Ala Glu Gly Ile Ala Val Ala Glu Ile Asp Leu Asn Gln
 275 280 285
 Ile Ile Tyr Gly Lys Trp Leu Leu Asp Pro Ala Gly His Tyr Ser Thr
 290 295 300
 10 Pro Gly Phe Leu Ser Leu Thr Phe Asp Gln Ser Glu His Val Pro Val
 305 310 315 320
 Lys Lys Ile Gly Glu Gln Thr Asn His Phe Ile Ser Tyr Glu Asp Leu
 15 325 330 335
 His Glu Asp Lys Met Asp Met Leu Thr Ile Pro Pro Arg Arg Val Ala
 340 345 350
 20 Thr Ala

5 - Micro-organisme contenant la séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2.

6 - Micro-organisme contenant la séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2 sur un plasmide comportant un moyen de sélection.

25 7 - Micro-organisme constitué par la souche *E. coli* TG1 contenant le plasmide pXL2148, souche référencée G4207 et déposée dans la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes sous le n° I-1242.

8 - Micro-organisme contenant une cassette d'expression constituée de la séquence d'ADN selon la revendication 1 ou 2 sous la dépendance de signaux assurant l'expression de cette séquence dans le micro-organisme hôte.

30 9 - Micro-organisme selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend en amont de la séquence d'ADN un site de fixation des ribosomes et une séquence promotrice homologue ou hétérologue du polypeptide produit.

10 - Micro-organisme selon la revendication 9, caractérisé en ce que le promoteur peut être le promoteur de l'opéron tryptophane P_{trp} de *E. coli*, le promoteur de l'opéron lactose Plac de *E. coli*; le promoteur droit du phage lambda PR, le promoteur gauche du phage lambda PL, des promoteurs forts de *Corynebacterium*, de *Comamonas* ou de *Pseudomonas*.

11 - Micro-organisme selon la revendication 9, caractérisé en ce que le site de fixation des ribosomes peut être celui dérivé du gène CII du phage lambda ou ceux dérivés de gènes de *E. coli*, *Comamonas*, *Pseudomonas* ou *Corynebacterium*.

40 12 - Micro-organisme selon les revendications 8 à 11, caractérisé en ce que la cassette d'expression est portée par un plasmide comportant un moyen de sélection.

13 - Micro-organisme selon la revendication 12, caractérisé en ce que le moyen de sélection est un marqueur conférant la résistance à un antibiotique.

45 14 - Micro-organisme selon les revendications 5 à 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les souches *E. coli*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*.

15 - Micro-organisme selon l'une quelconque des revendications 5 à 14, caractérisé :

- en ce qu'il contient au moins un agent protéique d'aide au repliement des polypeptides qu'il synthétise et, en particulier, des polypeptides selon la revendication 3 ou la revendication 4 et/ou les gènes codant pour un tel agent,
- 50 - et en ce que cet agent est présent dans une quantité supérieure à celle correspondant au niveau de base du micro-organisme considéré.

16 - Micro-organisme selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'agent est la chaperone GroE de *E. coli* ou son homologue d'origine eucaryote ou procaryote.

55 17 - Micro-organisme selon la revendication 15 ou la revendication 16, caractérisé en ce que les gènes codant pour l'agent sont portés par le chromosome ou par un élément extra-chromosomique (plasmide, phage) et en ce qu'ils sont amplifiés.

18 - Micro-organismes selon la revendication 17, caractérisés en ce que les gènes codant pour l'agent sont sous la dépendance de systèmes d'expression homologues ou hétérologues audit micro-organisme.

19 - Procédé de transformation enzymatique de nitriles caractérisé en ce qu'il consiste à mettre en contact les nitriles avec un polypeptide ayant une activité nitrilase selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4 ou un micro-organisme hôte selon l'une quelconque des revendications 5 à 19.

20 - Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le nitrile est un dinitrile de formule NC - R - CN dans laquelle R est un groupe alkylène ayant de 1 à 10 atomes de carbone.

21 - Procédé selon l'une des revendications 19 et 20, caractérisé en ce que le nitrile est l'adiponitrile.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

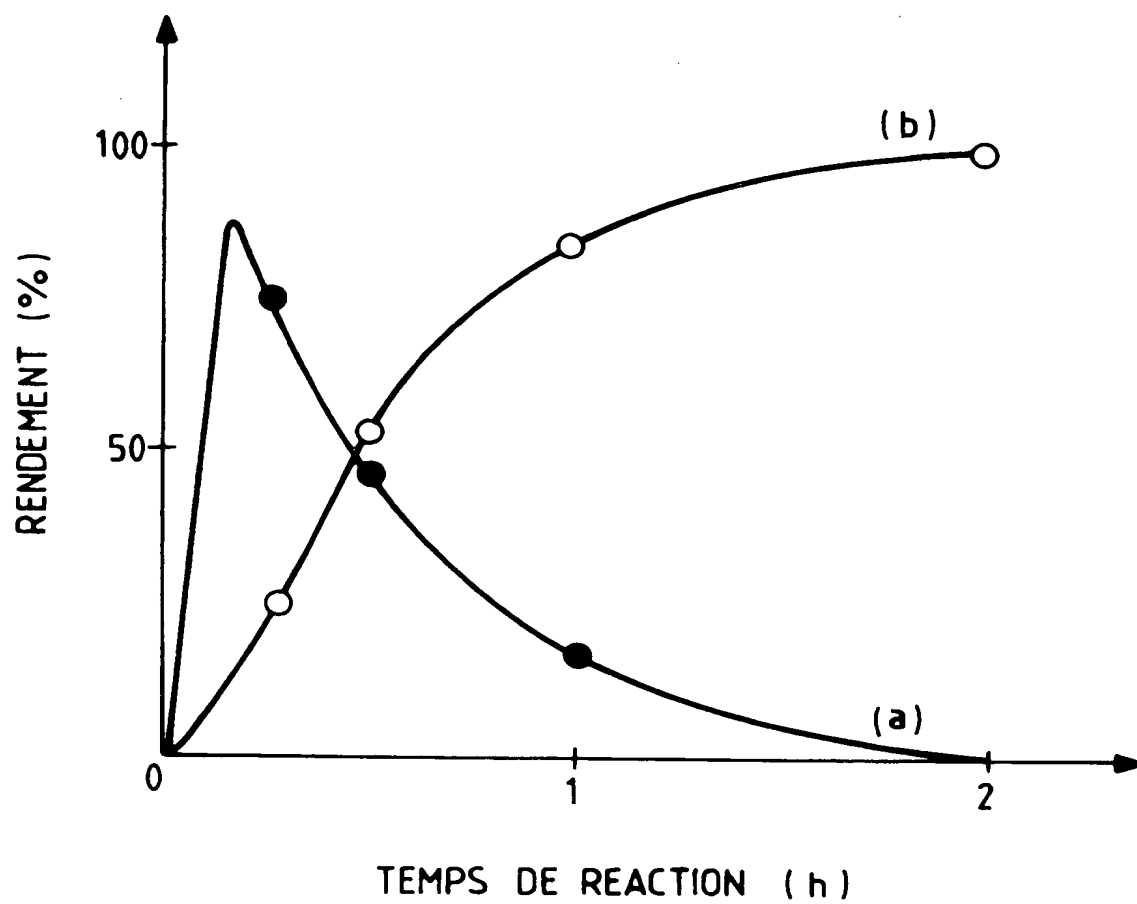


FIG. 1

FIG. 2a

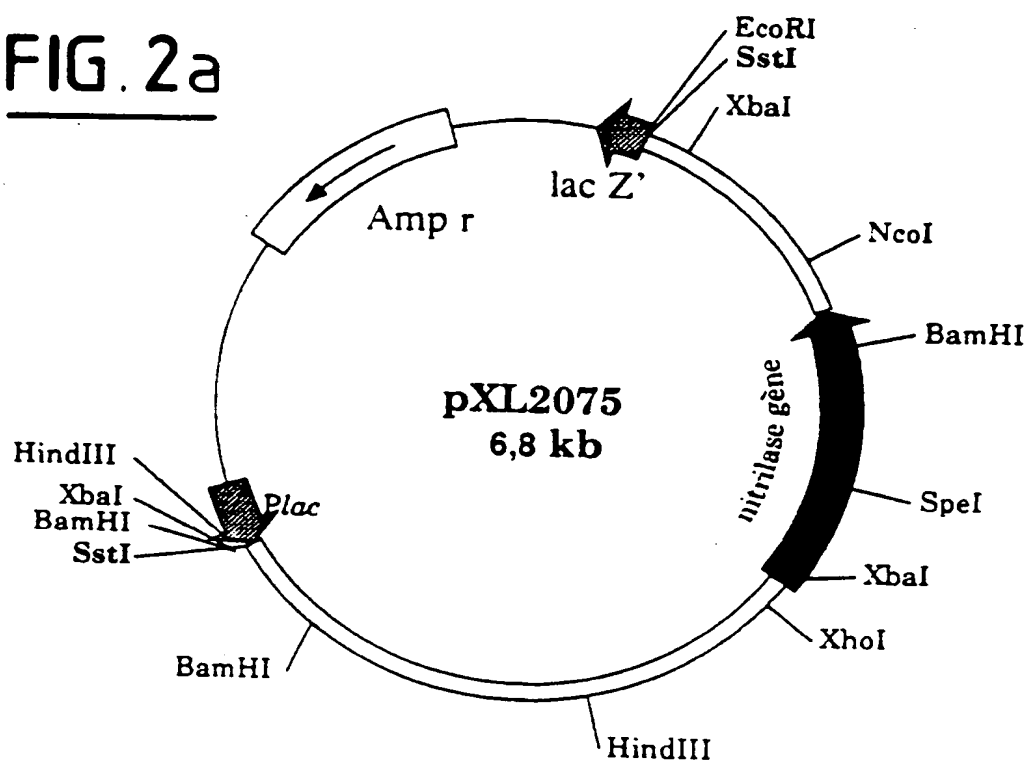
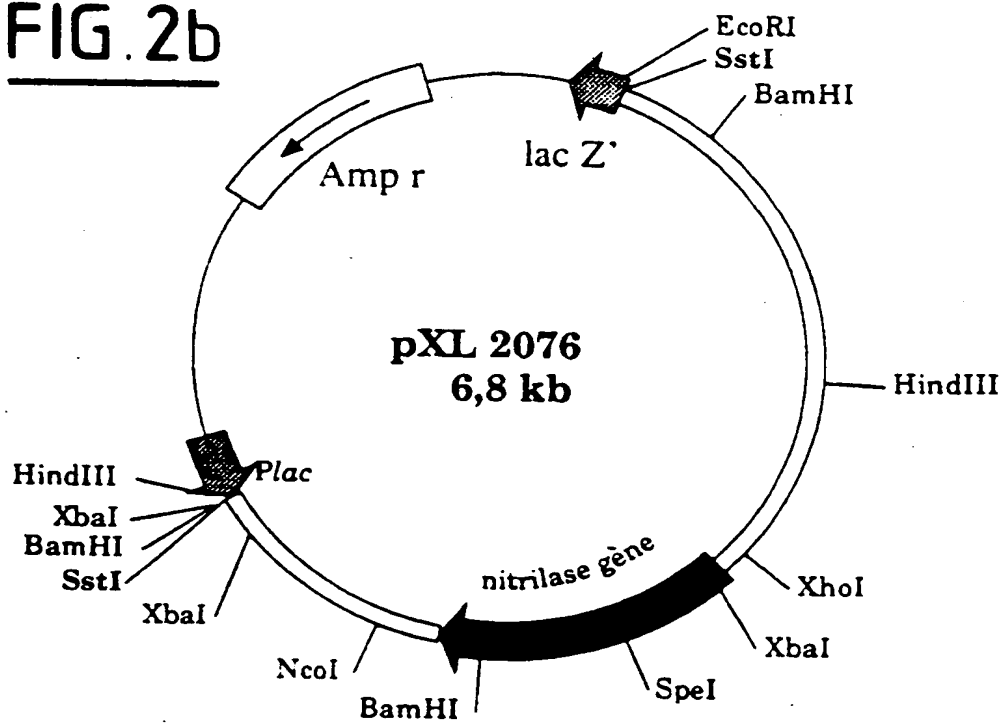


FIG. 2b



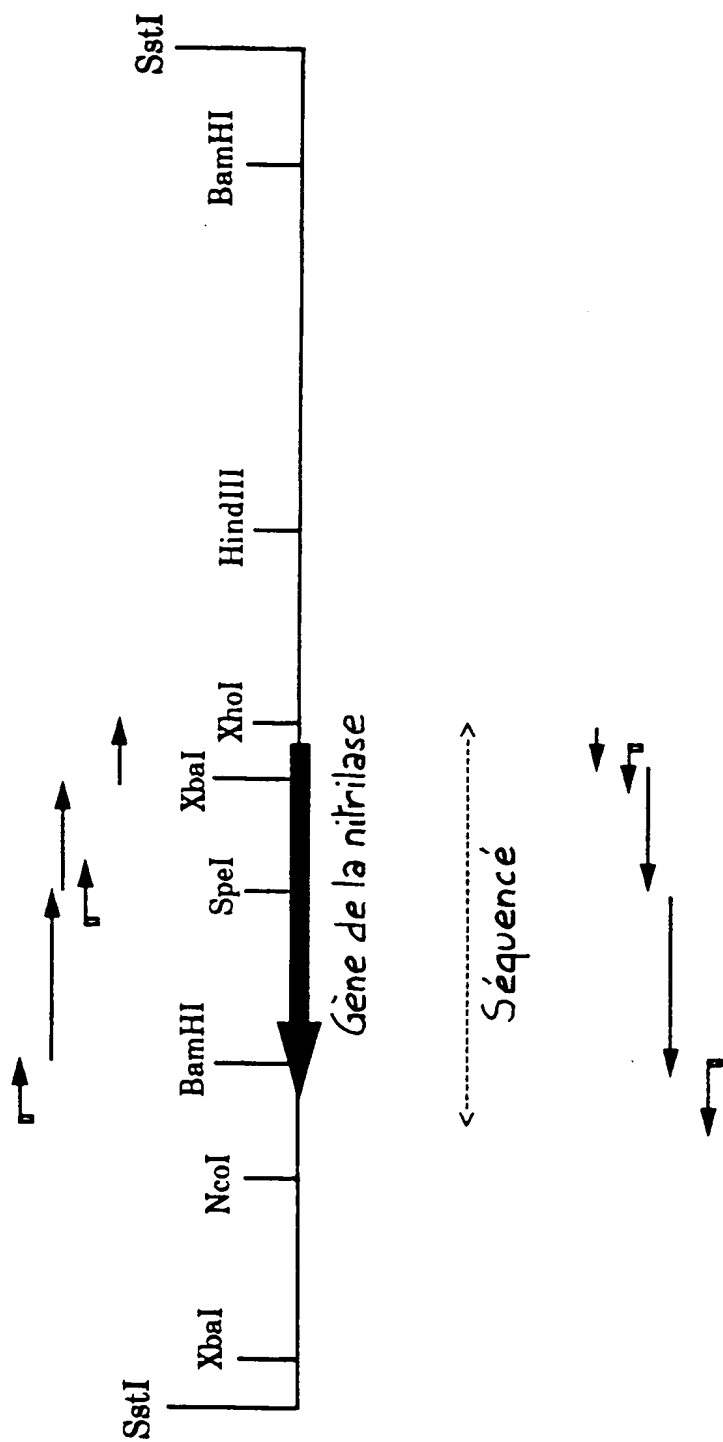


FIG. 3

200bp

→ Oligonuclease spécifique

← Amorceur universel

FIG. 4

(voir suite)

```

ctgagagacaaaattgggacagtcgccccctatatctgcaaaatgggaacctcttgcacatctataaaattttt 72

tgaggaagacagca' ATG AAA AAT TAT CCT ACA GTC ARG GTA GCA GCA GTG CAA GCT 128
      Met Lys Asn Tyr Pro Thr Val Lys Val Ala Ala Val Gln Ala 14

GCT CCT GTA TTT ATG AAT CTA GAG GCA ACA GTA GAT AAA ACT TGT ARG TTA ATA 182
Ala Pro Val Phe Met Asn Leu Glu Ala Thr Val Asp Lys Thr Cys Lys Leu Ile 32

GCA GAA GCA GCA TCT ATG GGC GCC ARG GTT ATC GGC TTC CCA GAA GCA TTT ATT 236
Ala Glu Ala Ala Ser Met Gly Ala Lys Val Ile Gly Phe Pro Glu Ala Phe Ile 50

CCC GGC TAT CCA TAT TGG ATT TGG ACA TCA AAT ATG GAC TTC ACT GGA ATG ATG 290
Pro Gly Tyr Pro Tyr Trp Ile Trp Thr Ser Asn Met Asp Phe Thr Gly Met Met 68

TGG GCC GTC CTT TTC ARG AAT GCG ATT GAA ATC CCA AGC AAA GAA GTT CAA CAA 344
Trp Ala Val Leu Phe Lys Asn Ala Ile Glu Ile Pro Ser Lys Glu Val Gln Gln 86

ATT AGT GAT GCT GCA AAA AAG AAT GGA GTT TAC GTT TGC GTT TCT GTA TCA GAG 398
Ile Ser Asp Ala Ala Lys Lys Asn Gly Val Tyr Val Cys Val Ser Val Ser Glu 104

AAA GAT AAT GCC TCG CTA TAT TTG ACG CAA TTG TGG TTT GAC CCG AAT GGT AAT 452
Lys Asp Asn Ala Ser Leu Tyr Leu Thr Gln Leu Trp Phe Asp Pro Asn Gly Asn 122

TTG ATT GGC ARG CAC AGG AAA TTC ARG CCC ACT AGT AGT GAA AGA GCT GTA TGG 506
Leu Ile Gly Lys His Arg Lys Phe Lys Pro Thr Ser Ser Glu Arg Ala Val Trp 140

GGA GAT GGG GAT GGA AGC ATG GCT CCC GTA TTT AAA ACA GAG TAT GGG AAT CTT 560
Gly Asp Gly Asp Gly Ser Met Ala Pro Val Phe Lys Thr Glu Tyr Gly Asn Leu 158

GGG GGA CTC CAG TGC TGG GAA CAT GCT CTC CCA TTA AAC ATT GCG GCG ATG GGC 614
Gly Gly Leu Gln Cys Trp Glu His Ala Leu Pro Leu Asn Ile Ala Ala Met Gly 176

```

TCA TTG AAC GAA CAG GTA CAT GTT GCT TCC TGG CCA GCC TTC GTC CCT AAA GGC	668
Ser Leu Asn Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Ala Phe Val Pro Lys Gly	194
GCA GTA TCA TCC AGA GTA TCA TCC AGC GTC TGT GCG TCT ACT AAT GCG ATG CAT	722
Ala Val Ser Ser Arg Val Ser Ser Val Cys Ala Ser Thr Asn Ala Met His	212
CAG ATC ATT AGT CAG TTT TAC GCG ATC AGC AAT CAG GTA TAT GTA ATT ATG TCA	776
Gln Ile Ile Ser Gln Phe Tyr Ala Ile Ser Asn Gln Val Tyr Val Ile Met Ser	230
ACC AAT CTC GTT GGC CAA GAC ATG ATT GAC ATG ATT GGG AAA GAT GAA TTT TCC	830
Thr Asn Leu Val Gly Gln Asp Met Ile Asp Met Ile Gly Lys Asp Glu Phe Ser	248
AAA AAC TTT CTA CCG CTT GGT TCT GGA AAC ACA GCG ATT ATT TCT AAC ACC GGT	884
Lys Asn Phe Leu Pro Leu Gly Ser Gly Asn Thr Ala Ile Ile Ser Asn Thr Gly	266
GAG ATT TTG GCA TCA ATT CCA CAA GAC GCG GAG GGA ATT GCT GTT GCA GAG ATT	938
Glu Ile Leu Ala Ser Ile Pro Gln Asp Ala Glu Gly Ile Ala Val Ala Glu Ile	284
GAC CTT AAC CAA ATA ATT TAT GGA AAG TGG TTA CTG GAT CCC GCC GGT CAT TAC	992
Asp Leu Asn Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Trp Leu Leu Asp Pro Ala Gly His Tyr	302
TCT ACT CCC GGC TTC TTA AGT TTG ACA TTT GAT CAG TCT GAA CAT GTA CCC GTA	1046
Ser Thr Pro Gly Phe Leu Ser Leu Thr Phe Asp Gln Ser Glu His Val Pro Val	320
AAA AAA ATA GGT GAG CAG ACA AAC CAT TTC ATC TCT TAT GAA GAC TTA CAT GAA	1100
Lys Lys Ile Gly Glu Gln Thr Asn His Phe Ile Ser Tyr Glu Asp Leu His Glu	338
GAT AAA ATG GAT ATG CTA ACG ATT CCG CCG AGG GCG GTA GCC ACA GCG TGA tcgc	1155
Asp Lys Met Asp Met Leu Thr Ile Pro Pro Arg Arg Val Ala Thr Ala	354
cgccctcggggcggttcggttgctgtagccatgcctt	1194

FIG. 4

(suite)

FIG. 5

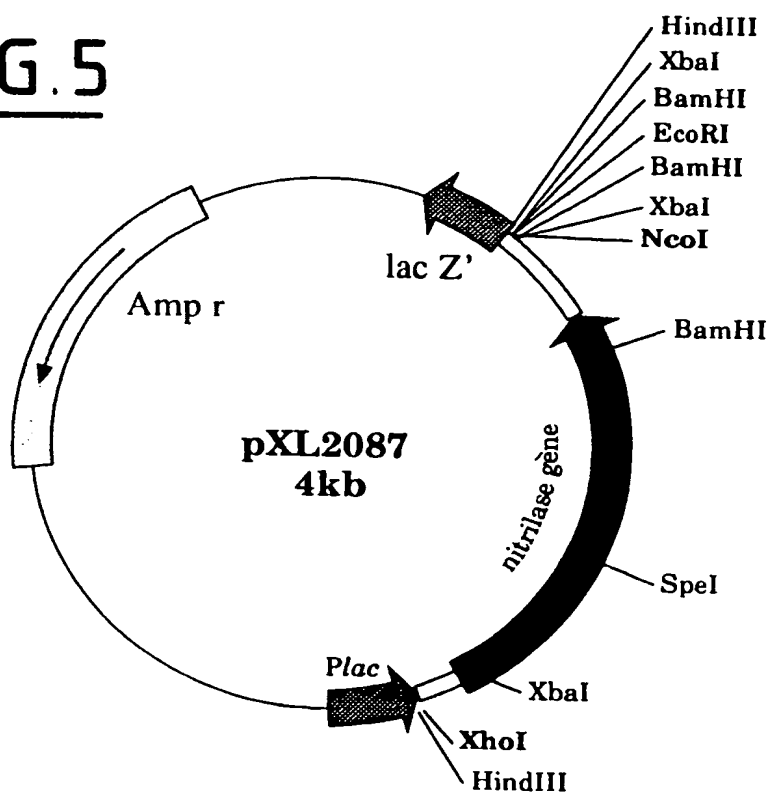
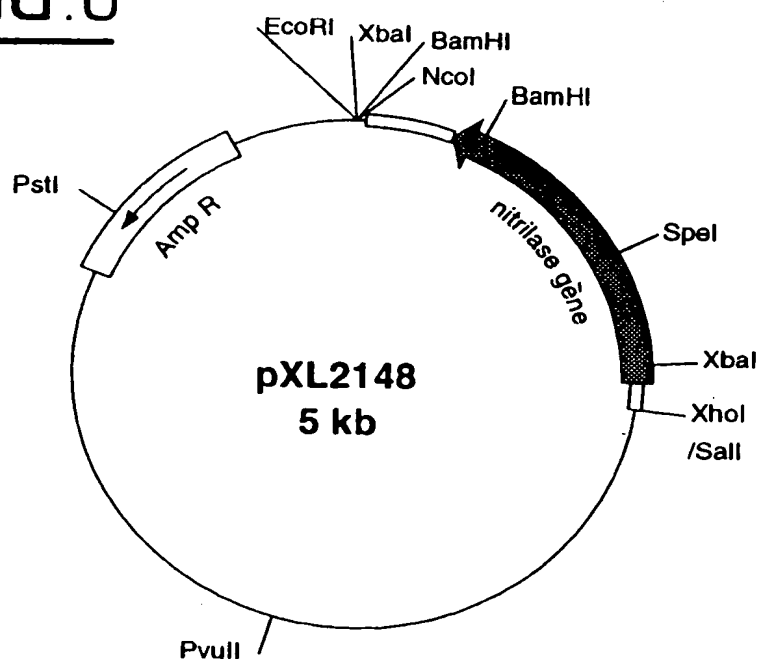


FIG. 6



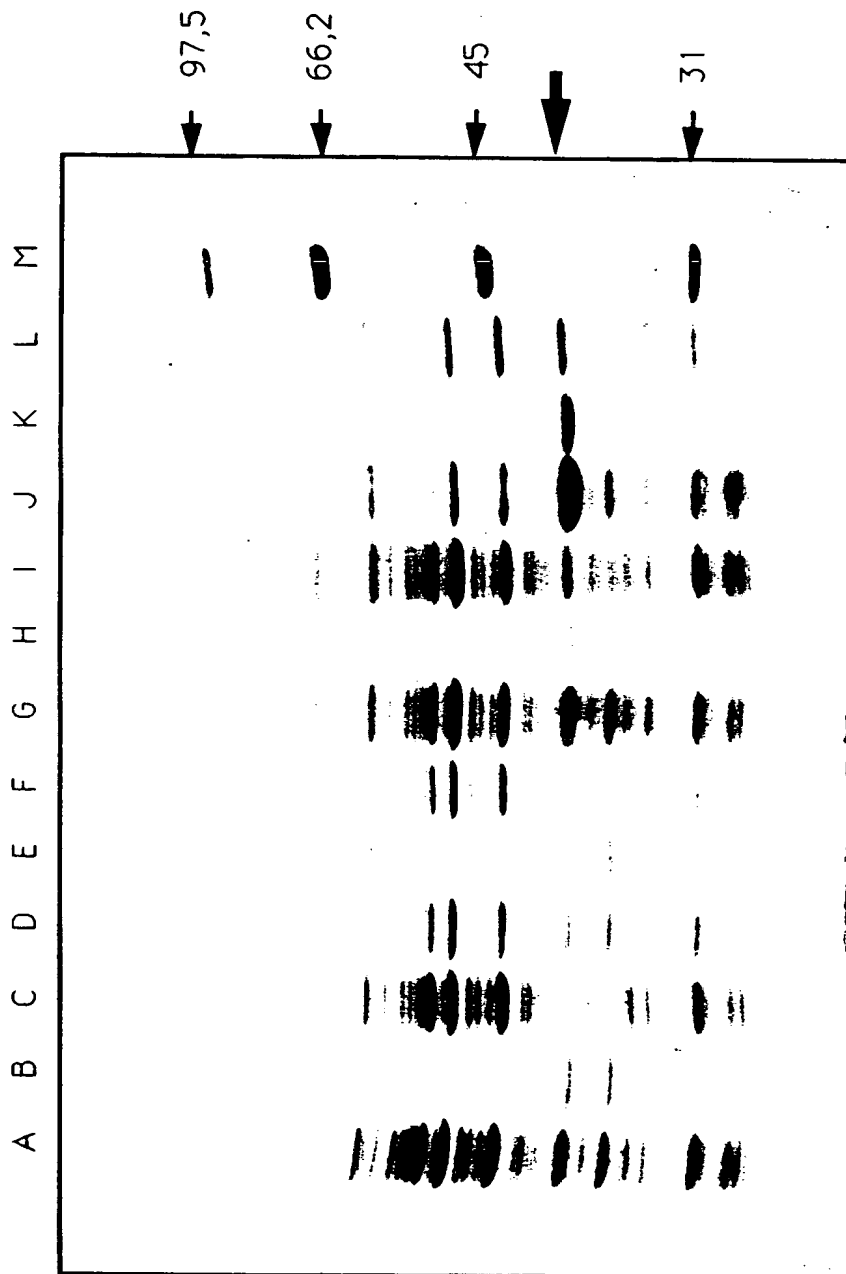


FIG. 7

FIG. 8

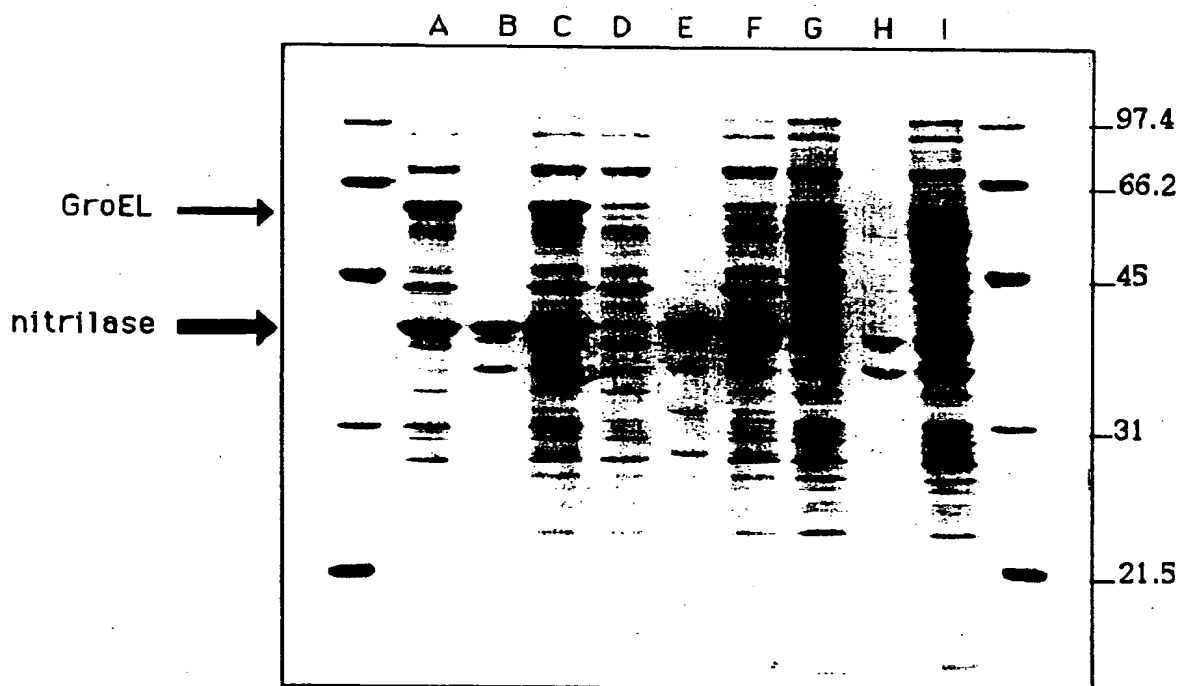
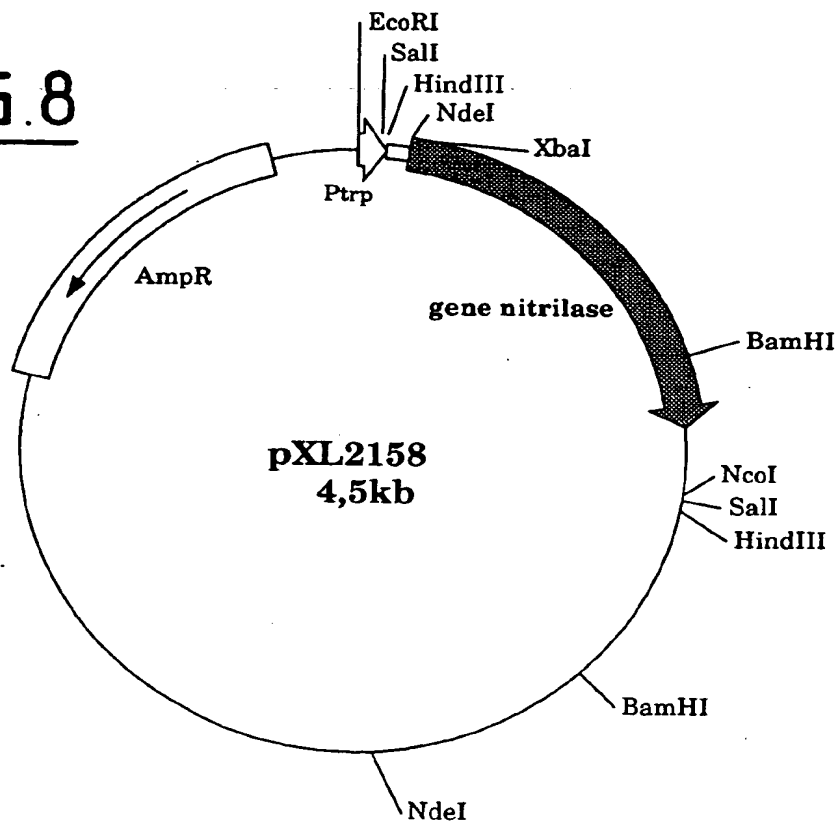


FIG. 9

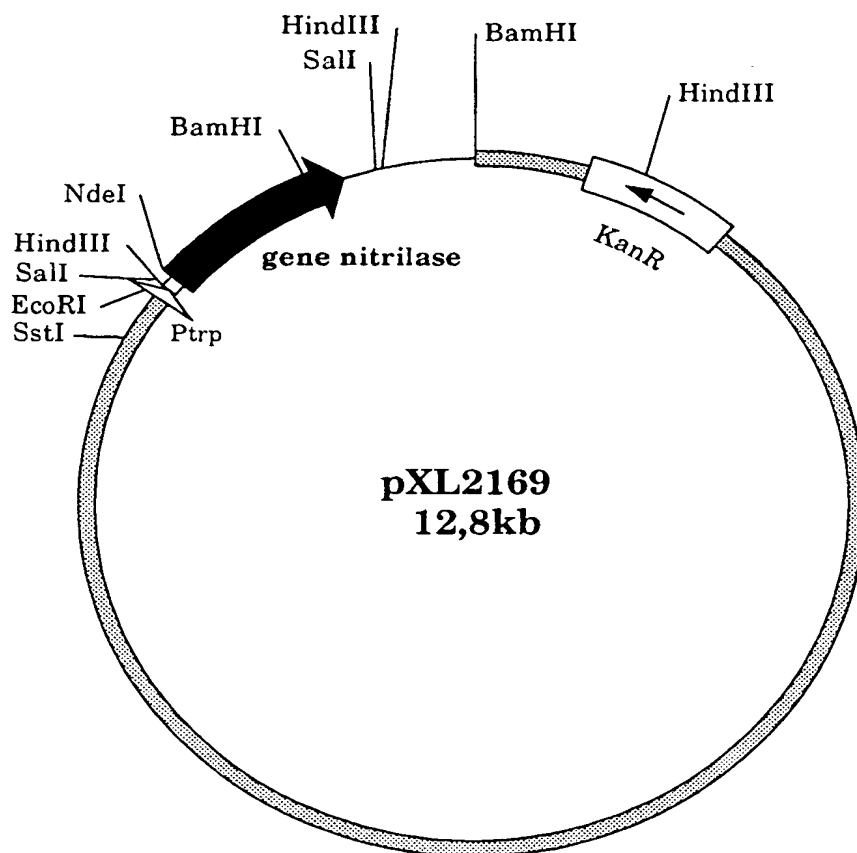


FIG. 10

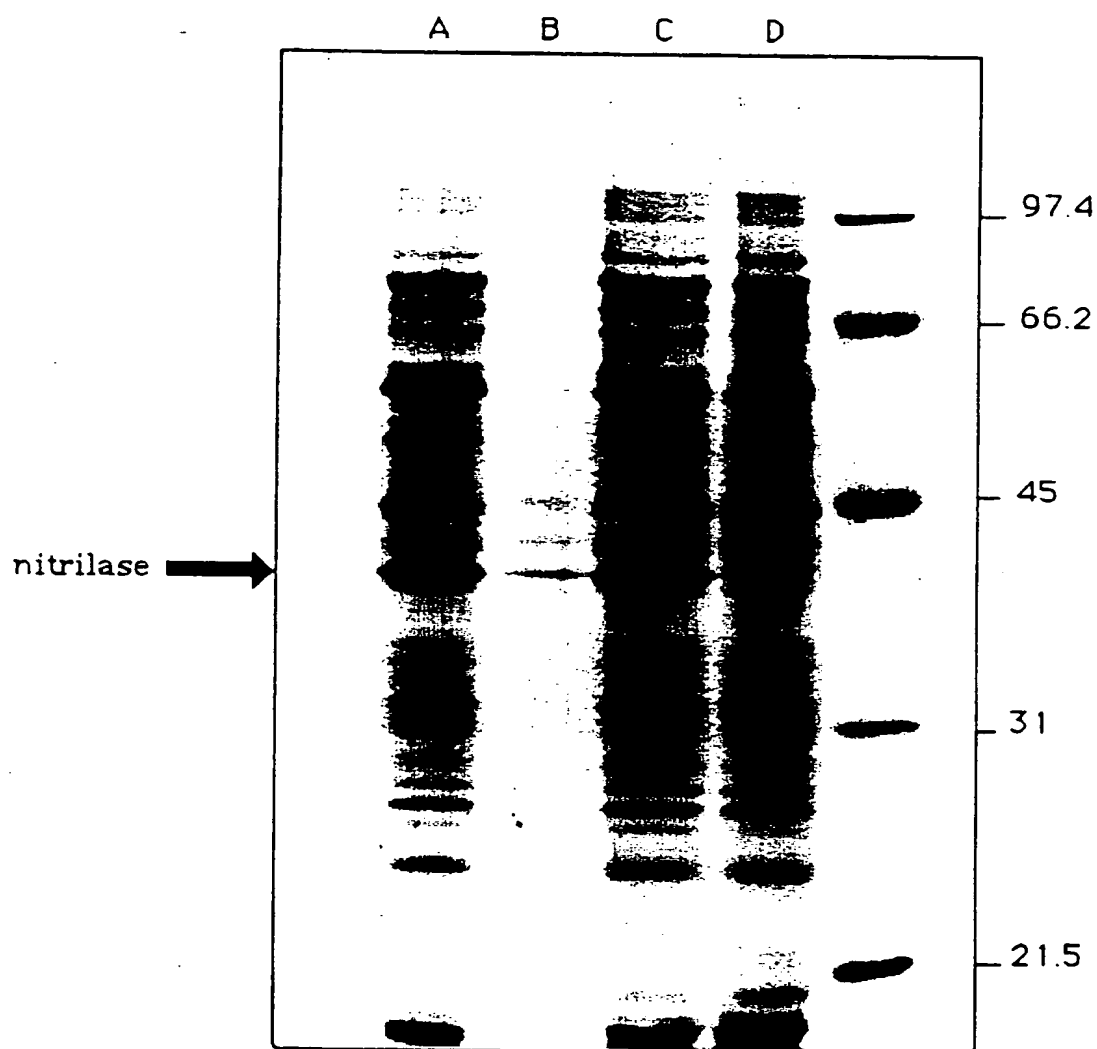


FIG. 11



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande
EP 93 42 0334

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
A	WO-A-89 00193. (RHONE POULENC AGROCHIMIE) * page 3, ligne 2 - ligne 14 * * page 4, ligne 9 - ligne 19 * * page 5, ligne 6 - ligne 27 * * page 7, ligne 10 - ligne 22 * * page 8, ligne 13 - ligne 24 *	1,5-8, 14,19	C12N15/55 C12N9/78 C12N1/21 C07K3/08 C12P7/40 C12P7/44 //(C12N1/21, C12R1:19)
A	US-A-4 629 700 (WILLIAM D. PREVATT ET AL.) * colonne 2, ligne 32 - colonne 3, ligne 41 *	1,3,5, 19,20	
A	EP-A-0 412 465 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) * colonne 1, ligne 36 - colonne 2, ligne 25 * * colonne 2, ligne 44 - colonne 3, ligne 6 *	15,16	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
			C12N C07K C12P
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 14 Janvier 1994	Examinateur MONTERO LOPEZ, B
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 (03.92) (P44C08)

